

Fotokjemisk internalisering for behandling av kreft

Studier av celle-invasjon og migrering

Ismihan Yildiz



Masteroppgave for graden Master i farmasi

Avdeling for galenisk farmasi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2014



UNIVERSITETET I OSLO

Farmasøytisk institutt

Fotokjemisk internalisering for behandling av kreft

Studier av celle- invasjon og migrering

Masteroppgave for graden Master i farmasi ved Seksjon for strålingsbiologi

Ismihan Yildiz

Veiledere: Dr. Anette Weyergang og Prof. Kristian Berg

Medveileder for praktisk gjennomføring av oppgaven: PhD student Cathrine

Elisabeth Olsen

15.mai 2014



Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Seksjon for strålingsbiologi, Institutt for kreftforskning, Radiumhospitalet i perioden august 2013 til mai 2014. Det har vært svært utfordrende og lærerikt å jobbe med denne oppgaven.

Tusen takk til mine veiledere Anette Weyergang og Kristian Berg for god veiledning og støtte gjennom hele prosjektet. Jeg vil også takke Cathrine Elisabeth Olsen, PhD student master i Farmasi, for all den gode hjelpen jeg har fått gjennom hele masterperioden. Dere har vært kritiske, alltid vært tilgjengelige for meg, og ikke minst gitt meg mulighet til å være mer selvstendig på laboratoriet.

Det har vært et veldig faglig og sosialt miljø å jobbe i denne avdelingen. Tusen takk til alle i PCI-gruppen som alltid har stilt opp, og alltid vært til god hjelp. Dere er en utrolig fin gjeng.

Å ha andre masterstudenter i den samme situasjonen, har hjulpet veldig med å holde motivasjonen oppe under hele masterperioden. Tiden hadde aldri blitt det samme uten dere, Hassina Hassan og Karin Ekholt. Tusen takk for en utrolig koselig tid sammen, og alle de faglige- og ikke-faglige diskusjonene vi har hatt. Jeg ønsker dere begge lykke til videre i livet. Jeg vil også takke familie og venner for all den støtten de har gitt meg.

Radiumhospitalet, Oslo 15. Mai 2014

Innhold

FORKORTELSER.....	6
SAMMENDRAG.....	9
1 INNLEDNING	11
1.1 HVA ER KREFT?	11
1.1.1 <i>Metastasering og migrering</i>	12
1.1.1.1 MAPK familien og migrering.....	14
1.1.1.2 FAK.....	15
1.2 FOTODYNAMISK TERAPI	18
1.2.1 <i>Virkningsmekanisme</i>	18
1.2.1.1 Type 1 og type 2 reaksjoner	19
1.2.1.2 Lys	20
1.2.1.3 Fotosensitisere.....	21
1.2.2 <i>PDT representerer en selektiv behandling for kreft</i>	21
1.2.3 <i>Cellulære effekter av PDT</i>	22
1.2.3.1 Apoptose.....	22
1.2.3.2 Nekrose	22
1.2.3.3 Autofagi.....	22
1.2.4 <i>Effekter av PDT på solide tumorer</i>	23
1.2.4.1 Direkte effekt	23
1.2.4.2 Ødeleggelse av blodåresystemet /vaskulaturen	24
1.2.4.3 Aktivisering av immunsystemet.....	24
1.2.5 <i>Klinisk PDT i Norge i dag</i>	25
1.3 FOTOKJEMISK INTERNALISERING	27
1.3.1 <i>Virkningsmekanismer bak PCI</i>	27
1.3.2 <i>Hvilke legemidler kan leveres med PCI?</i>	29
1.3.2.1 Bleomycin.....	30
1.3.2.2 Toksiner og immunotoksiner	30
1.3.3 <i>PCI er svært selektivt og effektivt</i>	32
2 MATERIALER OG METODE	34
2.1 CELLELINJE OG DYRKNINGSMEDIUM.....	34
2.1.1 <i>Hvorfor modellen ble valgt</i>	34
2.2 SPLITTING AV CELLER	34
2.3 TELLING AV CELLER FOR UTSÅING TIL FORSØK	35
2.4 UTSÅING AV CELLER	35
2.5 FOTODYNAMISK TERAPI OG FOTOKJEMISK INTERNALISERING.....	36

2.5.1	<i>Lyskilde</i>	36
2.5.2	<i>Fotosensitiser</i>	36
2.5.3	<i>Makromolekyler</i>	36
2.5.4	<i>Fotodynamisk terapi (PDT)</i>	36
2.5.5	<i>Fotokjemisk internalisering (PCI)</i>	37
2.6	MÅL PÅ VIABILITET- MTT-ASSAY	38
2.7	ANALYSE AV PROTEIN UTTRYKK VED SDS-PAGE/ WESTERN BLOTT	39
2.7.1	<i>Prøveopparbeidelse</i>	40
2.7.2	<i>Bestemmelse av relativ proteinmengde med DNA måling</i>	40
2.7.3	<i>SDS-PAGE</i>	41
2.7.4	<i>Western Blotting</i>	43
2.7.5	<i>Immunodeteksjon</i>	44
2.7.6	<i>Bildebehandling av Western blott</i>	44
2.7.7	<i>Loading kontroll</i>	46
2.8	MIGRERINGSASSAY VED BRUK AV BOYDEN-KAMMERE	47
2.8.1	<i>Studier av cellemigrering med Boyden-kammer etter PDT og PCI</i>	48
2.8.1.a)	<i>Fotodynamisk terapi og fotokjemisk internalisering uten serumgradient</i>	48
2.8.1.b)	<i>Fotodynamisk terapi og fotokjemisk internalisering med serumgradient</i>	49
2.9	MIGRERING AV 4T1 CELLER VED SÅRHELINGSASSAY	50
2.10	INHIBERING AV SIGNALVEIER SOM KAN VÆRE AV BETYDNING FOR OVERLEVELSE	51
3	RESULTATER	52
3.1	PDT- OG PCI BEHANDLING	52
3.1.1	<i>Cellulær overlevelse etter PDT og PCI med økende lysdoser</i>	52
3.1.2	<i>Cellulær overlevelse etter PDT og PCI med økende toksin konsentrasjoner</i>	53
3.2	PDT- OG PCI BEHANDLEDE CELLERS EVNE TIL Å MIGRERE; VED BOYDEN-KAMMER ANALYSER	54
3.2.1	<i>Migrering uten serumgradient</i>	54
3.2.2	<i>Migrering med serumgradient</i>	56
3.3	PDT- OG PCI BEHANDLEDE CELLERS EVNE TIL Å MIGRERE; SÅRHELINGSASSAY	57
3.3.1	<i>Cellemigrering rett etter behandling</i>	58
3.3.2	<i>Cellemigrering 24 timer etter behandling</i>	60
3.4	ANALYSE AV P38 OG FAK SIGNALERING	62
3.5	EFFEKT AV P38 AKTIVERING PÅ OVERLEVELSE ETTER PDT OG PCI	64
4	DISKUSJON	65
4.1	DISKUSJON AV RESULTATER	65
4.2	DISKUSJON AV MATERIALER OG METODE	72

4.2.1	<i>Uønsket belysning.....</i>	72
4.2.2	<i>Overlevelse målt med MTT assay.....</i>	72
4.2.3	<i>Telling og utsåing av celler</i>	72
4.2.4	<i>Håndtering av Boyden kammer utstyr.....</i>	73
4.3	VIDERE STUDIER	73
5	KONKLUSJON.....	75
	REFERANSER	76
	VEDLEGG	80

Forkortelser

5-ALA	5-aminolevulinic acid
ATP	adenosin trifosfat
Bcl-2	b-celle lymfom 2
BPD-MA	benzoporfyrinmonosyrederivat
BSA	bovint serumalbumin
CD8 ⁺ T	cytotoksisk T celle
COX-2	cyclooxygenase-2
DC	dendrittisk celle
DMSO	dimetylsulfoksid
DNA	deoksyribonukleinsyre
DTT	dithiotreitol
ECM	ekstracellulære matriks
EDTA	etylendiamintetraacetat
EGF	epidermal vekstfaktor
EGFR	epidermal vekstfaktor reseptor
ERK	ekstracellulær signalregulert kinase
EPCAM	epitelcelle adhesjonsmolekyl
FAK	fokal adhesjon kinase
FAT	fokal adhesjon targeting
FERM	protein 4.1, ezrin, radixin, moesin
Grb2	vekstfaktor reseptor bundet protein 2

HAL	heksaminolevulinat
HER-2	human epidermal vekstfaktor
HIF-1 α	hypoksi-induserende faktor 1- α
H ₂ O ₂	hydrogen peroksid
HRP	horseradish peroxidase
IL	interleukin
JNK	c-Jun N-terminal proteinkinase
LDL	lav tetthet lipoprotein
MAPK	mitogen-aktivert proteinkinase
MAPKAPK	MAP-kinase-aktivert proteinkinase
MAPKK	MAP kinase kinase
MAPKKK	MAP kinase kinase kinase
MEK	mitogen-aktivert proteinkinase
MKK	MAPK kinase kinase
MMP	matrix metalloproteinases
MOMP	mitokondrie ytre membran permeabilisering
m-THPC	meta-tetra(3-hydroksyfenyl)klorin
MTT	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazolium-bromid
O ₂	dioksigen
¹ O ₂	singlettoksygen
OH [·]	hydroksylradikal
PBS	fosfat-bufret saltvann
PCI	fotokjemisk internalisering
PDGF	plate-derivert vekstfaktor
PDT	fotodynamisk terapi
PGF	placenta vekst faktor

PI3K	phosphatidylinositide 3-kinases
PLCgamma	phospholipase C
Pp38	fosforylert p38
PpIX	protoforfyrin IX
PS	fotosensitiser
rGel	rekombinant gelonin
RIP	ribosominaktiverende protein
ROS	reaktive oksygenforbindelser
PVDF	polyvinylidendifluorid
SB203580	4-(4-fluorofenyl)-2-(4-metylsulfinylfenyl)-5-(4-Pyridyl)-imidazol
SDS	sodium-dodecyl-sulfat
SDS-PAGE	sodium-dodecyl-sulfat-polyakrylamid-gel-elektroforese
SH2	src Homology 2
SH3	src Homology 3
Src	proto-onkogen tyrosin-protein kinase
Thr	threonin
TPCS _{2a}	disulfonert tetrafenylklorin
Tyr	tyrosin
VEGF	vaskulær endotel vekstfaktor
VEGFR-2	vaskulær endotel vekstfaktor reseptor

Sammendrag

4T1 er en trippel-negativ brystkreft cellelinje som er assosiert med høy aggressivitet, migrering og metastasering *in vivo*. Vaskulær endotel vekstfaktor reseptor (VEGFR)-1 ble i denne oppgaven vist å være overuttrykket i 4T1, og kunne derfor bli benyttet som et mål for en spesifikk intracellulær levering av legemidler rettet mot kreftceller med høyt migreringspotensialet. Fotokjemisk internalisering (PCI) er en metode for intracellulær levering av membran-impermeable makromolekyler til cellenes cytosol. PCI har vist å være svært effektiv i å bedre cytosolisk levering av målrettede toksiner basert på type-1 inaktiverende proteintoksiner, slik som gelonin. PCI av det VEGFR målrettede toksinet vaskulær endotel vekstfaktor₁₂₁/rekombinant Gelonin (VEGF₁₂₁/rGel) ble i denne oppgaven vist å være en effektiv metode for å redusere viabiliteten av 4T1 celler.

Et sårhelingsassay og Boyden kammer analyse ble benyttet for å studere effekten av PCI av VEGF₁₂₁/rGel på 4T1 cellers evne til å migrere. Det ble vist at både fotodynamisk terapi (PDT) og PCI hemmet cellers evne til å migrere i et sårhelingsassay, men PCI så ut til å hemme migreringen over et lengere tidsrom enn PDT. Ingen forskjell i cellemigrering ble funnet etter PDT og PCI i Boyden kammer analysene. For å undersøke celledifferensiering av betydning for migrering, ble western blott analyser av aktivert og total p38 og fokal adhesjon kinase (FAK) utført. Fosforyleringen av FAK var inhibert etter PDT og PCI av VEGF₁₂₁/rGel, og kan indikere at FAK inhibering er involvert i PDT og PCI induisert hemming av migrering. Fosforyleringen av p38 var økt etter PDT og PCI av VEGF₁₂₁/rGel.

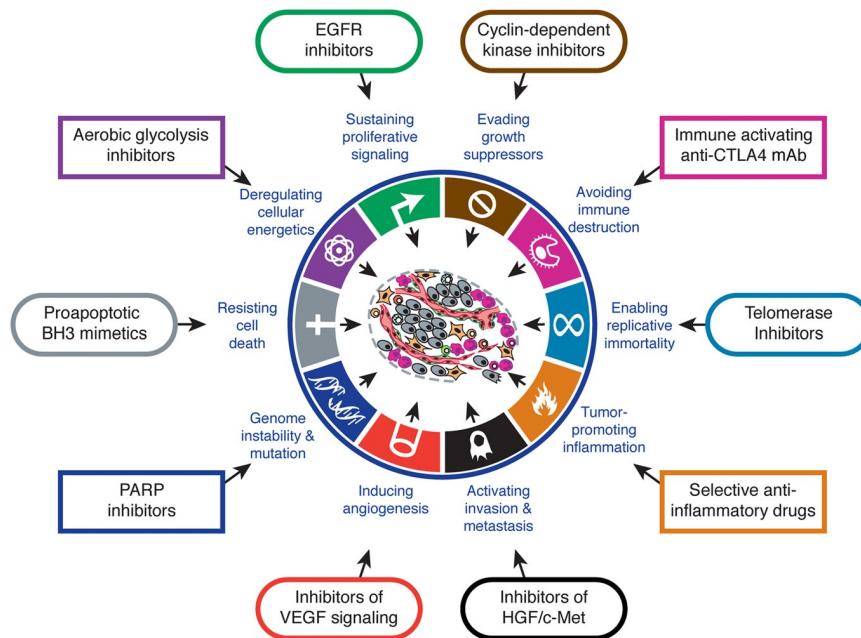
Forsøk med p38 inhibitoren 4-(4-fluorofenyl)-2-(4-metylsulfinylfenyl)-5-(4-Pyridyl)-imidazol (SB203580) viste ingen effekt på PDT og PCI induisert overlevelse, men signaleringen kan likevel være viktig for migreringspotensialet etter behandling.

1 Innledning

1.1 Hva er kreft?

En kreftcelle kan kjennetegnes ved flere egenskaper. Disse inkluderer opprettholdelse av prolifererende signalering, hemming av vekstdemping, resistens mot celledød, uendelig replikasjon, induksjon av angiogenese, tumorfremmende inflammasjon, ustabilt genom, mutasjoner, deregulering av cellulære energiveier, nedsatt immundestruksjon, invadering og metastasering (figur 1) [1]. For at en normal celle skal kunne utvikle seg til en kreftcelle, må det foregå en eller flere mutasjoner, som igjen gir opphav til en eller fler av de overnevnte kjennetegnene. Det finnes i dag legemidler for alle kjennetegnene beskrevet over. På tross av dette er kreft fremdeles en av våre store folkesykdommer og bedre behandlingsformer er ettertraktet. I Norge dør ca. 11000 mennesker årlig av kreft. Lungekreft, tykktarmskreft og prostatakreft er de kreftformene som tar flest liv blant menn, mens brystkreft, lungekreft og tykktarmskreft står for de fleste dødsfallene hos kvinner (<http://www.kreftregisteret.no>, april 2014. Statistikk fra 2011).

Denne oppgaven fokuserer på fotodynamisk terapi (PDT) og fotokjemisk internalisering (PCI), og hvordan disse behandlingene virker på cellers evne til å migrere og metastasere.



Figur 1: **Kjennetegn ved kreft:** Det er flere kjennetegn som kan drive en normal celle til å bli en kreftcelle. Figuren viser også en illustrativ liste over legemidler med ulike molekulære mål og virkningsmekanismer som kan gi en målrettet og selektiv legemiddelbehandling innen kreft. Hanahan et al. [1].

1.1.1 Metastasering og migrering

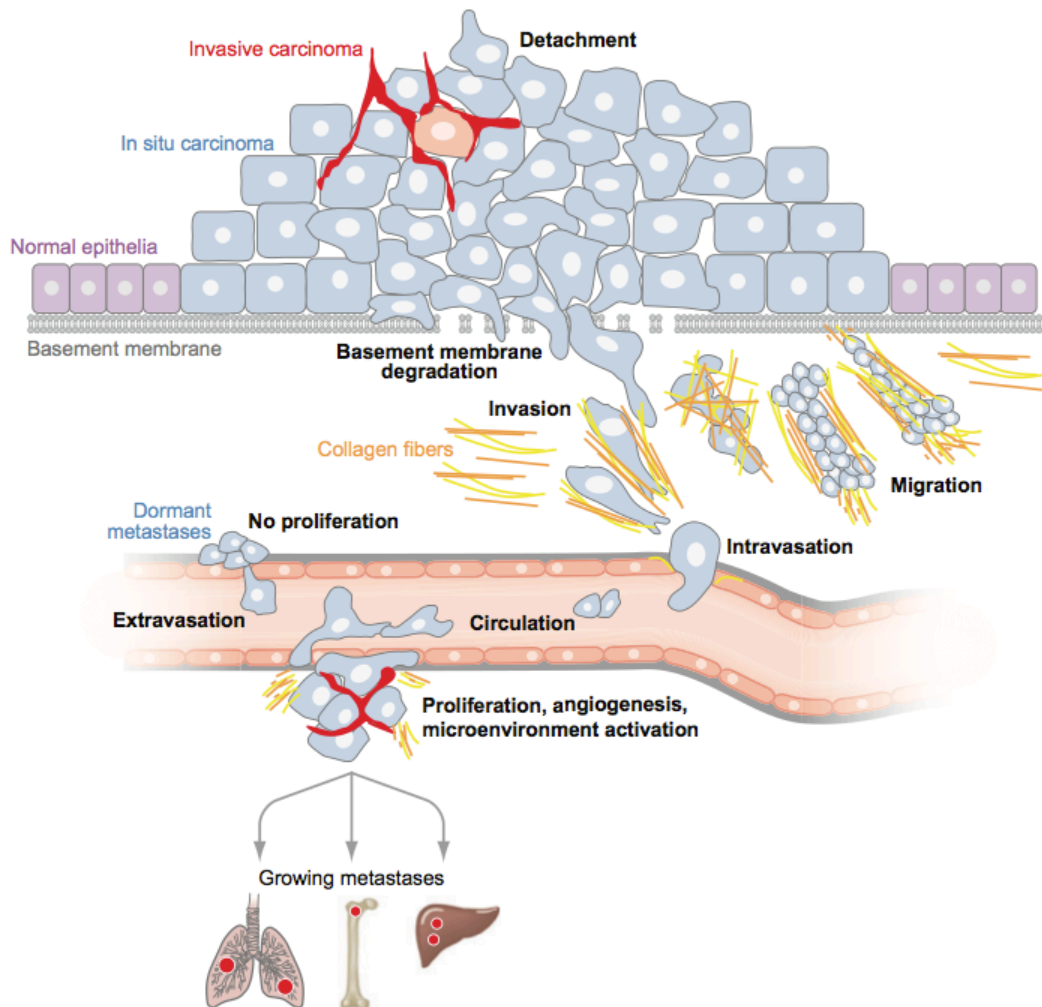
Cellemigrering er en sentral prosess i multicellulære organismer og kontrollerer målrettet bevegelse av celler fra et sted til et annet. Feil i cellens migreringsmaskineri kan gi opphav til kreft, og også metastase av etablert tumor. Metastasering står for 90 % av dødsårsakene ved kreft, og behandlinger som reduserer en tumors metastaseringspotensial er derfor av høy klinisk interesse [2].

Metastase er en flertrinnet prosess der celler beveger seg fra en primærtumor og etablerer seg i et annet organ [3]. Tumorcellen som igangsetter en metastatisk koloni må løsne fra primærtumoren, invadere lokalt vevs vev, penetrere det lokale lymfesystemet eller blodstrømmen, overleve innenfor sirkulasjonen og etablere seg i andre organ (figur 2) [2, 3].

Metastasering initieres ved endring av adhesjonsmolekyler på den kommende metastaserende cellens overflate. Adhesjonsmolekylene sørger normalt for at cellene er tett bundet til hverandre og til basalmembranen [3]. Ved invadering skjer det endring i binding mellom tumorcelle og omkringliggende celler, og til ekstracellulære matriks

1 INNLEDNING

(ECM). Proteolyttisk degradering av omkringliggende vev gjør at tumorcellen kan migrere gjennom vevet. Tumorcelleadhesjon til ekstracellulær matriks er mediert av integriner. Integriner er heterodimere transmembrane proteiner som binder seg til spesifikke proteiner i ECM, og kan overføre signaler inn og ut av cellen [4].



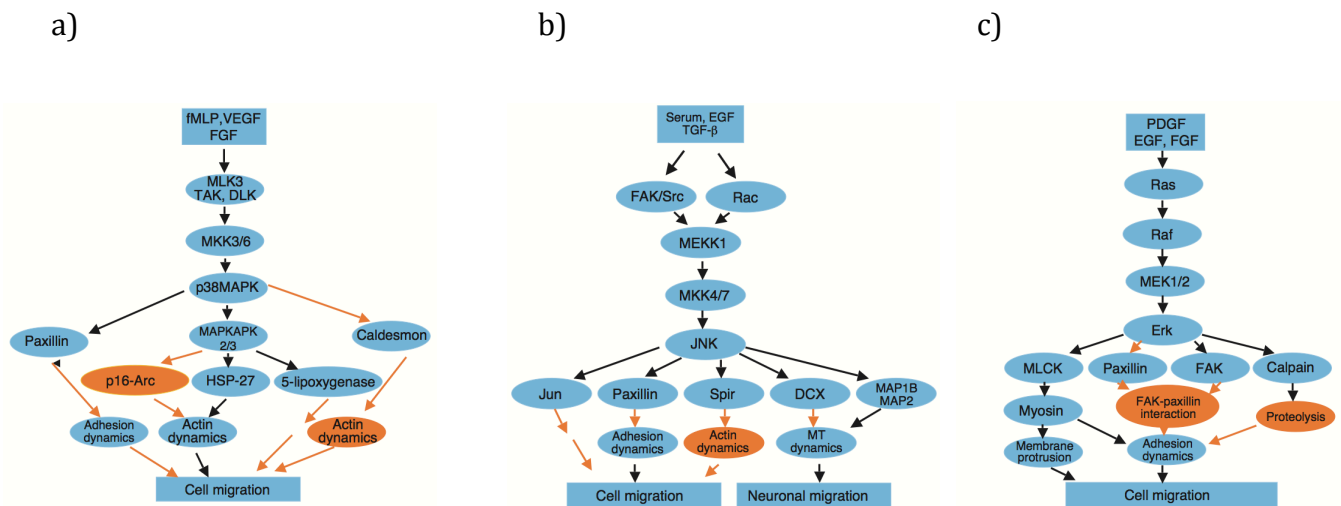
Figur 2: **Trinnene i metastase:** En kreftsvulst (*in situ carcinoma*) gjennomgår en mutasjon som gjør den i stand til å invadere omkringliggende vev. Dette skjer ved at adhesjonen opphører. Videre ødelegges basalmembranen og tumorcellene invaderer omkringliggende stroma. Tumorcellene kan videre migrere og komme inn i blodet eller lymfesystemet, og slik fraktes til andre organer hvor de kan etablere metastaser. Bacac et al. [3].

1 INNLEDNING

1.1.1.1 MAPK familien og migrering

Mitogen aktiverte protein kinaser (MAPKér) spiller en viktig rolle i cellemigrering ved å aktivere ulike signaleringsveier. MAPK'er er en familie av serin/threonin protein kinaser som har en threonin-x-tyrosin (Thr-x-Tyr) enhet innenfor aktiveringsgruppen av kinase domenet. MAPK'er aktiveres gjennom en kaskade hvor MAP kinase kinaser (MAPKKK'er) aktiverer MAP kinase kinaser (MAPKK'er), som igjen aktiverer MAPK'er ved å fosforilere threonin- og tyrosin delen [5]. MAPK familien inndeles i tre grupper avhengig av aktiveringsgruppen; ekstracellulær- signal- regulert protein kinase (Erk/MAPK) som har en Thr-Glu-Tyr enhet, p38 som har en Thr-Ala-Tyr enhet og c- Jun N-terminal protein kinase (JNK) som har en Thr-Pro-Tyr enhet (figur 3) [5].

P38 signalveien er studert i denne oppgaven.



Figur 3: **MAP kinaser og cellemigrering:** Signaleringsveier for cellemigrering mediert ved a) p38, b) JNK og c) Erk. De oransje veiene representerer antatte veier. Modifisert figur fra Huang *et al.* [5].

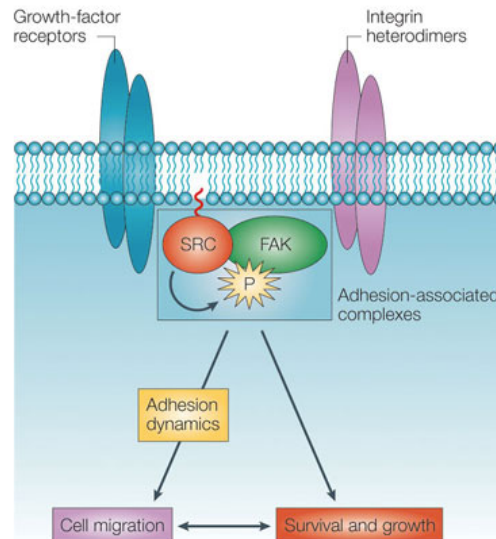
Det er fra tidligere kjent at p38 er involvert i inflammasjon, apoptose og celledifferensiering. Det er i nylige studier vist at p38 også er involvert i cellemigrering [5]. p38 spiller en viktig rolle i vekstfaktor- og cytokin- induert cellemigrering ved å fosforilere MAPK aktivert protein kinase 2/3 (MAPKAP 2/3), paxillin og caldesmon [5]. p38 MAPK'er er aktivert gjennom mitogen aktivert protein kinase kinase (MKK)-3 og

1 INNLEDNING

MKK6 [6]. p38 α regulerer induksjon av den proinflammatoriske mediatoren cyclooxygenase (COX)-2, som kan øke kreft progresjonen i ikke-melanom hudkreft, brystkreft og gliomaer [6]. p38 kan indusere økt uttrykning av matriks metalloproteinaser MMP1, MMP3 og MMP13 som degraderer matriksproteiner, og vaskulær endotel vekstfaktor (VEGF)-A som er en viktig overlevelses- og angiogenese stimuli for kreftcellene [6-8]. Hypoksi-induserende faktor-1 (HIF-1), som har en viktig rolle i angiogenese, kan også bli aktivert gjennom p38. p38 har også vist å regulere cellemigrering ved å remodulere aktin cytoskjelettet [6].

1.1.1.2 FAK

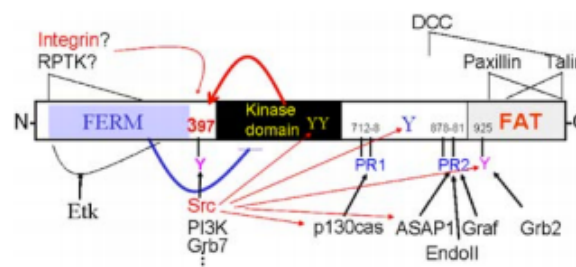
Ekstracellulær matriks, integriner og cellens cytoskjelett kommuniserer langs fokale adhesjoner, som er dynamiske kontakter av strukturelle og regulatoriske proteiner som overfører ytre signaler til cellens indre [9]. Fokale adhesjoner fester cellen til det underliggende ekstracellulære matriks eller til celleoverflatemolekyler på nabocellene [10]. Integriner er transmembrane reseptorer som binder ulike ekstracellulære matriks molekyler til den migrerende kreftcellen [11]. Fokal adhesjon kinase (FAK) er en gruppe av cytoplasmiske ikke-reseptor tyrosin kinaser som kan aktiveres av integriner (C-terminal del av FAK) og stimulere til motilitet og migrering [5]. FAK virker også nedstrøms for vekstfaktor-reseptorer (N-terminal del av FAK) og fremmer plate derivert vekstfaktor (PDGF) og epidermal vekst faktor (EGF)-stimulert cellemigrering [5, 12-14].



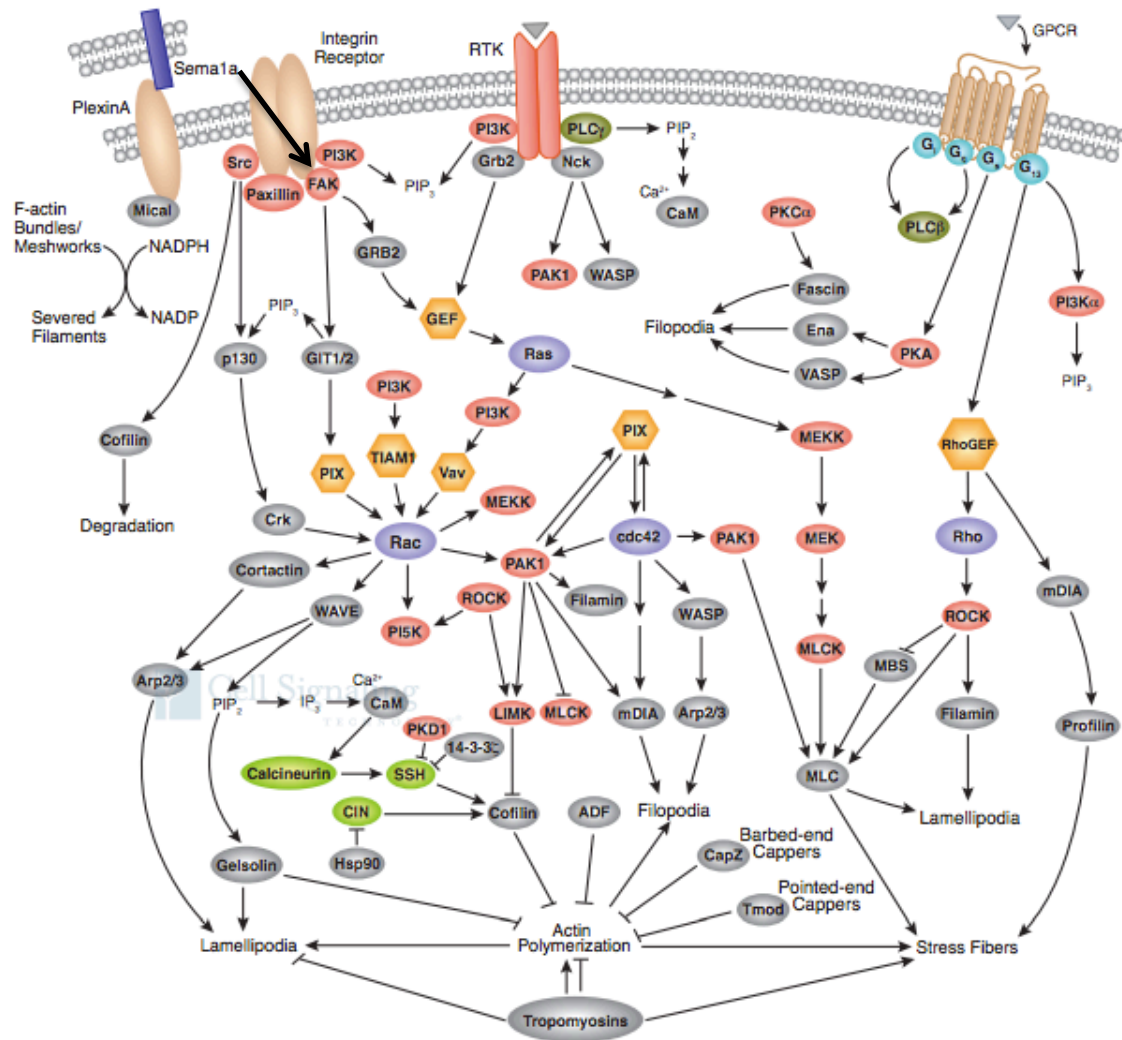
Figur 4: **Målretting av FAK til fokale adhesjoner.** <http://www.nature.com>, april 2014

FAK består av tre domener som er ansvarlige for lokaliseringen av FAK til den fokale adhesjonen; protein 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM)- domenet, kinase domenet og fokal adhesjon målstyrte (FAT) domenet.

FERM domenet regulerer FAK aktivering gjennom intramolekylær interaksjon med kinase domenet. Når FAK er inaktiv, er det en direkte kontakt mellom FERM og kinase domenet, som blokkerer det katalytiske setet og binder aktiveringsgruppen og autofosforyleringsdomenet Y397. Når FAK er aktiv, er FERM domenet fortrent ved et aktiverende protein. Dette fører til autofosforylering av Y397 som binder seg til proto-onkogen tyrosin-protein kinase (Src), og induserer høy katalytisk aktivitet av FAK (figur 4,5,6) [4, 15, 16].



Figur 5: **Sammensetningen til FAK:** FAK består av tre domener, FERM-, kinase- og FAT domenet. Zhao et al. [15].



Figur 6: **Regulering av aktin dynamikk.** Modifisert figur fra <http://www.cellsignal.com>, april 2014.

Fosforylering av FAK aktiverer nedstrømssignaler, gir økt kontrahering og aktin polymerisering. Dette stimulerer til økt celledigrering (figur 6) [17].

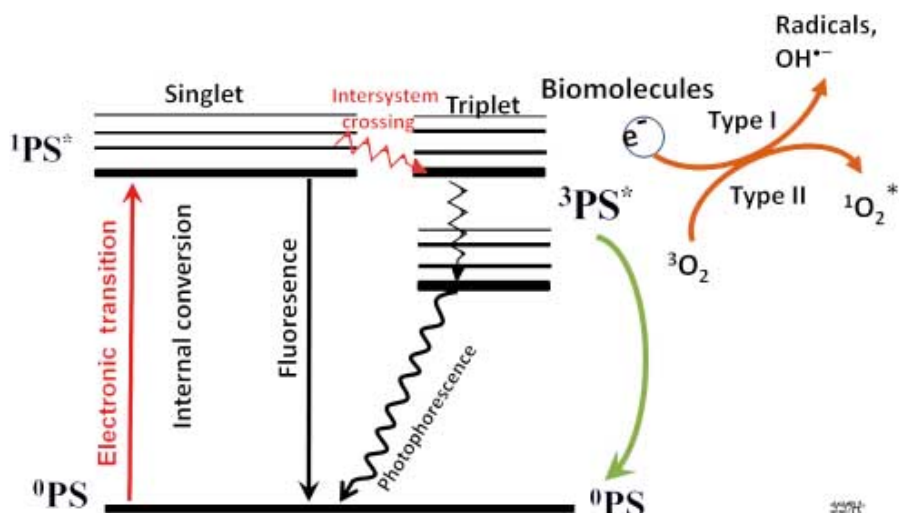
I flere studier er det vist at økt FAK aktivitet er forbundet med malign og metastaserende kreft [15, 18]. Det er særlig FAK-Src kompleksdannelse som er aktivert i mange tumorceller [13].

1.2 Fotodynamisk terapi

Lys har blitt brukt i terapi i mer enn tretusen år for å behandle ulike sykdommer, slik som rakitt, psoriasis, kutan tuberkulose, kopper og hudkreft [19]. På ca. 1900- tallet utviklet Niels Finsen fototerapi, bruk av lys til å behandle sykdommer, og PDT mot hudkreft med eosin som fotosensitiser kom omtrent samtidig med utviklingen til Finsen [19, 20]. Herman von Tappeiner og A Jordbauer introduserte begrepet "fotodynamisk" i 1907, og det første legemiddelet i PDT ble godkjent til bruk i Canada i 1999 [19].

1.2.1 Virkningsmekanisme

PDT er basert på lys, oksygen og fotosensitiser [19, 21]. Ingen av disse 3 komponentene er toksiske i seg selv (i anvendte doser), men sammen danner de reaktivt singlet oksygen som er toksisk, og kan forårsake celledød via apoptose, nekrose og autofagi [21]. Når PDT benyttes i kreftbehandling, blir energien fra lys overført via en fotosensitiser til molekylært oksygen, og gir opphav til reaktive oksygenforbindelser (ROS) som gir irreversibel skade på tumorvev (figur 7) [19].



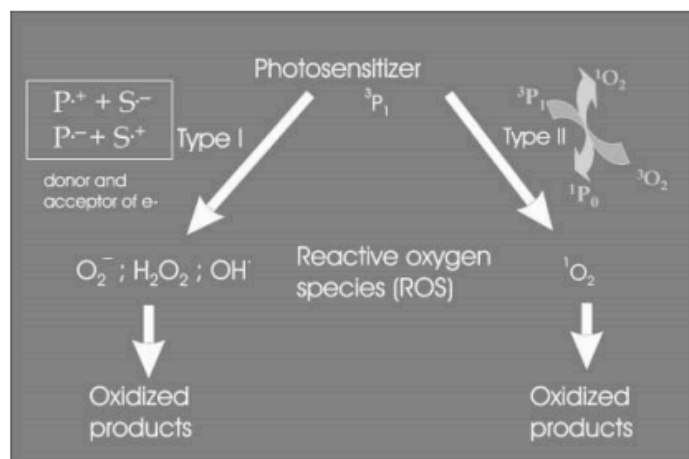
Figur 7: **Fotosensitisering fremstilt med Jablonski diagram.** Når lyset blir absorbert, eksiterer fotosensitiseringen fra grunntilstanden (0PS) over i en mer ustabil og kortlevd singlettilstand ($^1PS^*$) [19, 21]. Fotosensitiseringen kan emitte overskuddsenergien som fluorescens og/eller varme [19, 21]. Den eksiterte fotosensitiseringen kan også gå over i en mer stabil tripplettilstand ($^3PS^*$), som enten kan falle tilbake i grunntilstanden eller overføre dets energi til molekylært oksygen (O_2) eller et annet biomolekyl [19, 21]. Singlettilstanden til PS har vanligvis en levetid på nanosekunder (ns), og tripplettilstanden en levetid på mikrosekunder (μs) [19, 21]. <http://www.degruyter.com>, april 2014

1.2.1.1 Type 1 og type 2 reaksjoner

En eksitert fotosensitiser kan reagere videre på to måter: ved type 1 eller type 2 reaksjon (figur 7 og 8) [19, 21]. Hvilke reaksjoner som oppstår er avhengig av type fotosensitiser, konsentrasjon av substrater og oksygen, og binding mellom fotosensitiser og substrat [19]. Singlettoksygen (1O_2) som dannes under type 2 reaksjon ved at tripplettilstanden overfører dets energi til molekylært oksygen, er antatt å være den viktigste reaktive forbindelsen som dannes ved PDT. Type 2 reaksjoner er i PDT antatt å være mer vanlige enn type 1 reaksjoner når oksygen er tilstede [19, 21]. 1O_2 er svært reaktivt og har kort halveringstid, slik at kun celler i nærheten av der 1O_2 produseres er direkte påvirket av PDT [21].

Det er estimert at halveringstiden til 1O_2 i vev er $<0,04 \mu s$, og at dette gir en diffusjonslengde på 10-20 nm [22]. Cellemembranen har vanligvis en tykkelse på 10 nm,

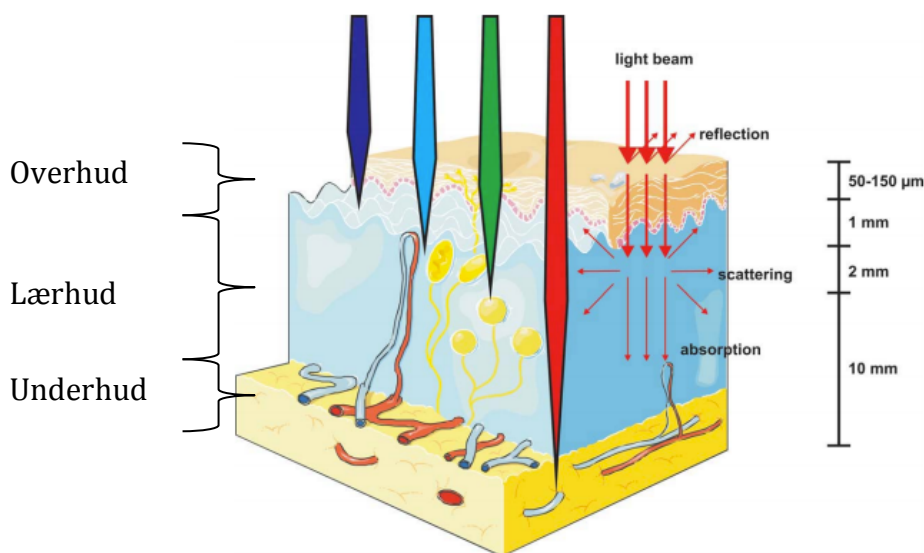
PDT behandling virker derfor ikke noe særlig dypere enn tykkelsen på en membran [19, 23].



Figur 8: **Type 1 reaksjon:** Under anaerobe forhold kan den aktiverte tripplettilstanden (3P_1) av fotosensitiser reagere direkte med et substrat, for eksempel en cellemembran eller et molekyl. Da vil det overføres et elektron eller et hydrogen til substratet, og det dannes frie radikaler [19]. Type I reaksjoner resulterer i produksjon av superoksid anion (O_2^{-}), hydrogenperoksid (H_2O_2) og hydroksyl radikal (OH^{\cdot}) [19, 21]. **Type 2 reaksjon:** Alternativt kan fotosensitiser i tripplettilstand overføre energien direkte til oksygen under aerobe forhold. O_2 er tripplett i sin naturlige tilstand, og med avgitt mengde energi konverterer den over til singlettoksygen (1O_2) som er meget reaktivt og kortlivd, og da går fotosensitiseren tilbake til grunntilstanden. Singlettoksygenet kan danne oksiderte produkter som er svært toksiske for cellen [19, 21]. Berg et al. [24].

1.2.1.2 Lys

Rødt lys og infrarød stråling penetrerer gjennom vev mer effektivt enn blått lys. Vev har et optisk terapeutisk vindu mellom 600-1200 nm. Lys med lavere bølgelengder har dårlig penetrasjon gjennom vev. Kun lys ved høyest 800 nm kan danne singlettoksygen, siden høyere bølgelengder ikke har nok energi til å sette i gang en slik fotodynamisk reaksjon. Valg av riktig kombinasjon av fotosensitiser (PS) og lys- kilde er viktig for å få en suksessfull PDT [21]. Jo høyere bølgelengde lyset har, desto lenger vil lyset penetrere inn i vevet, og derfor vil de fotosensitiserene som absorberer lys i det dyprøde område gi best tumorkontroll [21].



Figur 9: **Penetrering av lys gjennom hud.** Modifisert figur fra Agostinis *et al.* [21].

1.2.1.3 Fotosensitisere

En fotosensitiser er en kjemisk enhet, som ved å absorbere lys induserer en kjemisk eller fysisk endring av en annen forbindelse [24]. De fleste fotosensitisere brukt i PDT i dag er porfyriner eller porfyrin relaterte komponenter med en tetrapyrrol struktur. [24]. Photofrin som er en vannløselig blanding av hematoporfyrin derivater av porfimer natrium, var den første fotosensitiseren som ble brukt. Absorbansen av photofrin ved 630 nm, er, imidlertid begrenset og dette sammen med langvarig hudfotosensitivitet førte til utvikling av 2. generasjons fotosensitisere [21]. Den ideelle fotosensitiseren skal ha en effektiv absorpsjonstopp mellom 600-800 nm, absorbere fotoner effektivt, og ikke ha mørketoks [21, 25]. Halveringstiden i hud bør også være lav.

1.2.2 PDT representerer en selektiv behandling for kreft

PDT er tumorselektiv på flere måter. Siden lyseksponering kontrolleres til tumor, aktiveres kun fotosensitiser i tumoren. Siden fotosensitiseren ikke er toksisk med mindre den utsettes for lys, blir skade i normal-vev begrenset. Fotosensitisere er i tillegg vist å akkumulere 2-3 ganger mer i tumor-vev enn i normal-vev, dette har flere årsaker.

(i): Tumorer er preget av dårlig blodtilførsel og skaffer derfor ofte energien anaerobt. Dette gir økt akkumulering av melkesyre, som reduserer pH verdien i den

ekstracellulære delen av tumoren. Fotosensitisere er ofte svake baser og blir mer lipofile ved lave pH verdier. Dette gir dem økt evne til å diffundere inn i tumor [25]. (ii): Dårlig lymfedrenasje i tumorvev gir økt retensjon av fotosensitisere sammenlignet med normale vev [26]. (iii): Fotosensitisere er vist å binde seg til lav tetthet lipoprotein (LDL), og høyt uttrykk av LDL reseptorer i tumor bidrar til økt akkumulering av fotosensitiser [27].

1.2.3 Cellulære effekter av PDT

PDT kan fremkalle 3 forskjellige typer celledød; apoptose, nekrose og autofagi assosiert celledød (figur 10). Apoptose er antatt som hovedmekanisme bak PDT induisert celledød [21]. Tidligere forskning har vist at det kan være en sammenheng mellom lokalisering og dødssignaler, og at PS som lokaliserer til lysosomer og plasmamembraner induserer lite apoptose, mens PS som lokaliserer til mitokondria induserer mye [28].

1.2.3.1 Apoptose

Kromatin kondensering, kløyving av kromosomalt deoksyribonukleinsyre (DNA), cellekrymping og dannelse av apoptotiske legemer uten plasmamembranbrudd er karakteristika ved apoptose. Apoptotiske celler frigjør "finn meg" og "spis meg" signaler, slik at de kan bli spist av fagocytter. Caspase aktivering er karakteristisk signalering ved apoptose [21].

1.2.3.2 Nekrose

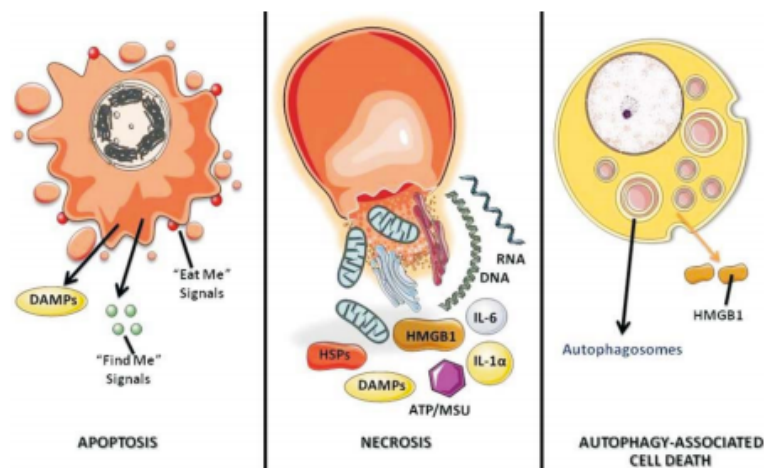
Nekrose kjennetegnes av vakuoledannelse av cytoplasma, og svelling og nedbryting av plasmamembranen. Dette gir en inflammatorisk reaksjon ved at det frigjøres cellulært innhold og proinflammatoriske molekyler. Adenosin trifosfat (ATP) nivået blir veldig lavt og helt uforenelig med celleoverlevelse [21].

1.2.3.3 Autofagi

Autofagi er en massiv vakuoledannelse av cytoplasma. Cytoplasma degraderer ved at dobbelmembran strukturen autofagosom, bryter ned cytoplasmatiske komponenter.

1 INNLEDNING

Ved autofagosom- lysosom sammensmeltning vil lysosomale hydrolaser degradere de cytoplasmatiske komponentene [21].



Figur 10: *Tre mekanismer for celledød*. Agostinis et al. [21].

1.2.4 Effekter av PDT på solide tumorer

PDT induserer tumordestruksjon ved tre prosesser [29]. ROS som er dannet under PDT kan gi tumorcellene en direkte skade og lede dem i apoptose, nekrose og/eller autofagi (se 1.2.3). PDT behandlingen kan også ødelegge den tumorassosierte vaskulaturen, og i tillegg aktivere en immunrespons mot tumorcellene [19, 29].

1.2.4.1 Direkte effekt

In vivo studier har vist at PDT kan redusere antall tumorceller gjennom direkte fotoskade, men denne effekten er ofte ikke nok for en fullstendig utryddelse av tumoren [19]. Manglende homogen tumordistribusjon av fotosensitiser, og begrenset oksygentilførsel til behandlede vev er antatt å gi begrensninger for direkte tumorcelle destruksjon [19]. Selv om mikrovaskulær skade og hypoksi etter PDT er vist å gi en langtids tumor respons, vil oksygenmangel som oppstår under behandling, begrense PDT responsen [19].

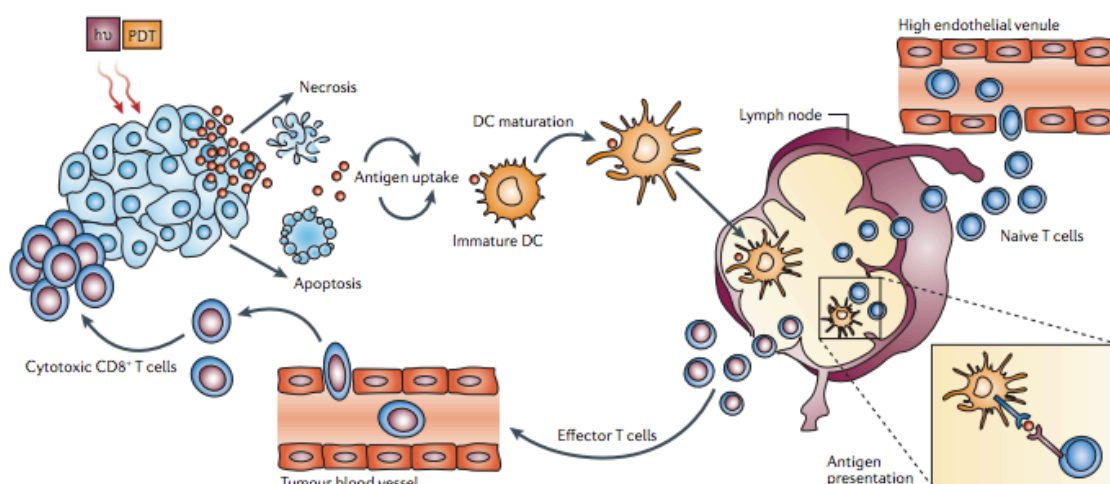
1.2.4.2 Ødeleggelse av blodåresystemet /vaskulaturen

Vekstfaktorer som produseres av tumoren er viktig for dannelse og opprettholdelse av tumorens blodtilførsel. Måltrettet behandling mot tumorvaskulaturen har blitt en ny tilnærming innenfor kreftterapi. Vaskulær konstriksjon, trombosedannelse er vist å føre til inhibert tumorvekst etter PDT med flere fotosensitisere, og denne antiangiogene effekten er også vist viktig for tumordestruksjon [19]. To potente angiogene faktorer; vaskulær endotel vekstfaktor (VEGF) og COX-2 er imidlertid vist oppregulert etter PDT som følge av ROS formering, og hypoksi induisert av behandling [19]. Det er derfor hypotisert at PDT også kan øke angiogenese [30].

1.2.4.3 Aktivering av immunsystemet

PDT kan aktivere både det medfødte og det ervervete immunsystemet. PDT induert oksidativt stress kan gi en akutt inflammatorisk reaksjon som sikrer at de ødelagte cellene blir fjernet, og er med på å fremme helingsprosessen, og gjenopprette den normale vevsfunksjonen. Inflammasjonen utløst ved PDT, er en ikke-spesifikk tumor-antigen prosess som igangsettes av det medfødte immunsystemet [21]. Tumorvaskulaturen blir permeabel for blodproteiner og proadhesiv for inflammatoriske celler, og nøytrofiler, mastceller, monocytter og makrofager invaderer raskt den PDT behandlede tumoren [21]. Særlig er det de inflammatoriske cytokinene interleukin (IL)-6 og IL-1 som har vist å være oppregulert, og ha en kritisk rolle i PDT [19, 21].

PDT kan også aktivere det ervervete immunsystemet. PDT aktiverer både humoral og celle- mediert antitumor immunitet ved det ervervete immunsystemet. I de fleste studiene gjennomført har fokus vært på evnen PDT har til å aktivere cytotoksiske (CD8⁺) T-celler. Modne T-celler er kritiske for aktivering av tumorspesifikke CD8⁺ T celler og induksjon av antitumor immunitet (figur 11) [21, 31].



Figur 11: **Fotodynamisk terapi aktiverer antigen-spesifikke T- celler:** Når fotosensitiser-bærende tumorceller blir belyst, induserer det til apoptose og nekrose. Tumorcellene blir fagocyttert av dendritiske celler (DC) som er akkumulert i den inflammatoriske responsen trigget ved PDT. Dendritiske celler modnes etter stimulering med cytokiner og går videre til lymfeknuten hvor de presenterer antigener til T-lymfocytter. Aktiverte T-lymfocytter modnes til effektor T-celler som migrerer til tumoren og dreper tumorcellen. Castano et al. [31].

1.2.5 Klinisk PDT i Norge i dag

5-aminolevulinsyre (5-ALA) og 5-ALA-metyl ester er godkjent for behandling av aktinisk keratose og basalcellekarsinom av huden, ved topisk påføring, etterfulgt av blått eller rødt lys [19]. Ameluz, er et 5-ALA basert legemiddel i Norge godkjent til behandling av mild til moderat aktinisk keratose i ansikt og i hodebunn. Etter lokal applisering metaboliseres 5-ALA til protoporfyrin IX (PpIX), en fotoaktiv forbindelse som akkumuleres intracellulært i de behandlede aktiniske keratoselesjonene, og ved belysning dannes det reaktivt oksygen som skader cellen (<http://www.felleskatalogen.no>, april 2014). 5-ALA har sine begrensninger i at den kun er effektiv i veldig tynne hudlesjoner. Administrering av store mengder 5-ALA vil gi en opphopning av PpIX, et fluorescerende porfyrin i målvevet. Ved belysning i det synlige spekteret kan fluorescens fra PpIX bli brukt til å stille en fotodynamisk diagnose (<http://www.felleskatalogen.no>, april 2014). 5-ALA blir også benyttet til visualisering av

1 INNLEDNING

malignt vev under kirurgi for malignt gliom hos voksne pasienter (<http://www.felleskatalogen.no>, april 2014), og Gliolan er et slikt legemiddel godkjent i Norge. Grunnet den lave effektiviteten av 5-ALA er det utviklet en metyl ester av denne; 5-ALA-metyl ester. 5-ALA-metyl ester gir en bedret hudpenetrering og derfor høyere effektivitet i tykke lesjoner. 5-ALA-metyl ester har videre høyere spesifitet, mindre systemisk distribusjon og gir mindre smerter ved lyseksponering. Metvix er et 5-ALA-metyl ester basert legemiddel i Norge godkjent til PDT behandling (<http://www.felleskatalogen.no>, april 2014).

Hexvix, et HAL (heksaminolevulinat)-basert legemiddel (heksyl ester av ALA), er godkjent i Norge og brukes kun ved diagnostiske formål som en del av diagnose, behandling og oppfølging av blærekreft hos pasienter med kjent blærekreft eller sterk mistanke om blærekreft. Intravesikal indrypping av heksaminolevulinat, vil akkumulere porfyriner intracellulært i lesjoner i blæreveggen i høyere grad enn i frisk blære. Intracellulære porfyriner er fotoaktive, fluorescerende forbindelser som avgir rødt lys ved belysning med blått lys, slik at kreftlesjoner lyser rødt mot en blå bakgrunn (<http://www.felleskatalogen.no>, april 2014).

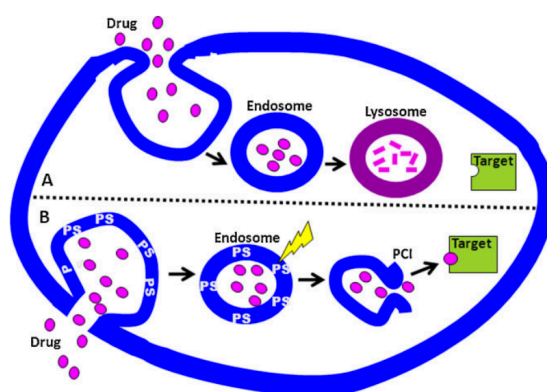
Foscan, et temoporfin, meta-tetra(hydroksyfenyl)klorin (m-THPC) er et annet fotosensitiserende legemiddel godkjent til PDT i palliativ behandling av pasienter med fremskredet plateepitelkreft i hode og hals, der tidligere behandling har vært mislykket, og pasienten ikke er egnet for strålebehandling, kirurgi eller systemisk kjemoterapi (<http://www.legemiddelverket.no>, april 2014). Visudyne er et legemiddel med det fotosensitiserende stoffet verteporfin, et benzoporfyrinmonosyrederivat (BPD-MA) som er godkjent i Norge til behandling av aldersrelatert makuladegenerasjon (<http://www.felleskatalogen.no>, mai 2014).

1.3 Fotokjemisk internalisering

Fotokjemisk internalisering (PCI), er PDT målrettet til cellens endocytiske vesikler for cytosolisk frigjøring av hydrofile makromolekylære legemidler.

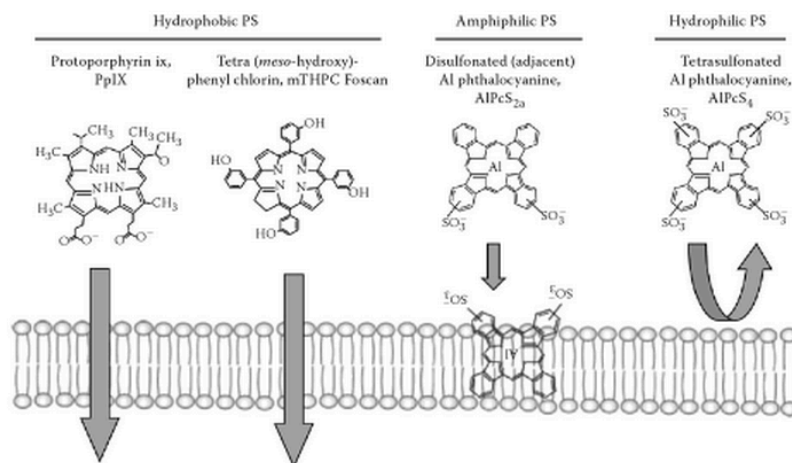
1.3.1 Virkningsmekanismer bak PCI

Enzymatisk degradering av makromolekylære legemidler i endocytiske vesikler etter opptak ved endocytose, er en intracellulær barriere for bruk av hydrofile makromolekyler som skal virke intracellulært [23] (figur 12).



Figur 12: **Opptak av makromolekyler ved endocytose:** Figuren illustrerer legemiddel og fotosensitiser som tas opp i cellen ved endocytose. Begge komponentene ender opp i endosomer. A) Uten lys tilstede vil innholdet bli degradert i lysosomer. B) Når cellen blir belyst, vil membranen åpne seg, og makromolekylene vil frigjøres i cytosol og utøve effekt. Weyergang *et al.* [32].

PCI baserer seg på lysaktivering av fotosensitisere lokalisert i membranen av endocytiske vesikler [33]. Fotosensitisere som blir brukt i PCI har amfifil struktur, med en hydrofil del som inhiberer penetreringen gjennom cellulære membraner, og en hydrofob del som klistrer seg i membranen. Slike fotosensitisere lokaliseres i vesikkelmembranen til endosomer og lysosomer (figur 13) [34].



Figur 13: **Fotosensitiser penetrering gjennom en cellulær membran er påvirket av kjemiske egenskaper:** Fotosensitisere med få sidegrupper som kan protoneres ved fysiologisk pH kan penetrere cellulære membraner, mens sterk amfifile og hydrofile fotosensitisere i stedet vil bli tatt opp i cellen via endocytose. Berg et al. [35].

Ved belysning, dannes det 1O_2 som lager et brudd i membranen, og de endocyterte molekylene blir frigjort og når deres intracellulære mål (se 1.2.1) [33].

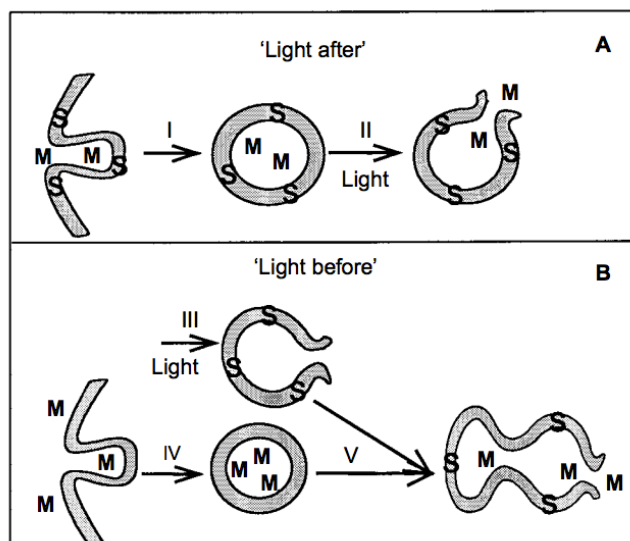
Det er to strategier for å levere makromolekyler med PCI; "lys før"- og "lys etter"-strategien (figur 14).

"Lys etter":

Ved "lys etter"- strategien utsettes cellene/vevet først for en fotosensitiser og molekylet som ønskes å bli levert. Disse lokaliseres i endosomer og/eller lysosomer. Ved belysning utløses det en fotokjemisk reaksjon, som ødelegger den lysosomale og/ eller endosomale membranen og innholdet i vesikkelen frigjøres i cytosol [23].

"Lys før":

Ved "lys før"- strategien gis den fotokjemiske behandlingen før molekylet man skal internalisere, slik at cellene blir belyst før de kommer i kontakt med makromolekylet. Denne metoden kan minske den fotokjemisk skade av makromolekylet, siden de fotokjemisk induserte reaksjonene er over når cellen blir introdusert for makromolekylet [23].



Figur 14: **Fotokjemisk internalisering ved "lys etter" og "lys først" strategi:** **A) "lys etter" strategi:** Fotosensitiseren (S) lokaliseres til plasmamembranen, og makromolekylet som skal internaliseres (M) blir invaginert i endocytiske vesikkelen. Både fotosensitiseren og makromolekylet blir tatt opp ved endocytose. Bestråling gir en fotokjemisk skade og brudd i endosomale membranen, og makromolekylet frigjøres i cytosol. **B) "lys først strategi":** Fotosensitiseren (S) tas opp ved endocytose, og lokaliseres i membranen av endocytiske vesikkelen. Bestråling av cellene gir skade på endosomale membranene. Deretter utsettes cellen for makromolekylet (M), som også tas opp i endocytiske vesikler. Vesikkelen med makromolekylet man ønsker å levere, smelter sammen med den fotokjemisk skadde vesikkelen. De sammensmeltede vesiklene er lekk, slik at makromolekylet kommer seg ut i cytosol. Prasmickaite et al. [36].

1.3.2 Hvilke legemidler kan leveres med PCI?

Terapeutika for fotokjemisk levering kan deles inn i fire hovedgrupper: proteiner, nukleinsyrer, syntetiske polymere for levering av kjemoterapeutika og andre molekyler som ikke klarer å penetrere cellemembranen og komme effektivt inn i cytosol [34].

PCI er brukt for å bedre den terapeutiske effekten av proteintoksiner og immunotoksiner som virker ved å inaktivere proteinsyntesen (Type1 RIPér), og også av peptider med biologisk aktivitet [23]. PCI er videre vist å øke effektiviteten av oligonukleotider ved å relokalisere oligonukleotider fra endocytiske vesikler og inn i

cytosol, og i noen tilfeller også inn i kjernen [23]. Genterapi mangler en effektiv og spesifikk levering av terapeutiske gener *in vivo*. De fleste terapeutiske gener tas opp i cellen ved endocytose, men mangler en effektiv translokasjon av genet ut av den endocytiske vesikkelen [23]. Fotokjemisk translokasjon av nukleinsyrer inn i cytosol har vist en bedret transgen aktivitet både når ikke-virale, adenovirale og adenoassosierte virale vektorer er brukt [23].

Noen kjemoterapeutika kan akkumulere uønsket endosomalt, og PCI kan her benyttes for å øke effekten av disse. PCI av slike kjemoterapeutika aktiverer det terapeutiske potensialet, og er i tillegg antatt å gi mindre bivirkninger [23, 34].

1.3.2.1 *Bleomycin*

Kjemoterapeutika må effektivt kunne penetrere inn i cellenes cytosol for å nå intracellulære mål. Hydrofile molekyler, som bleomycin, penetrerer plasmamembranen dårlig ved passiv diffusjon og akkumulerer endosomalt [37, 38]. Bleomycin er et vannløselig glykopeptid antibiotikum som danner brudd i enkelt- og dobbeltrådet DNA [37]. Bleomycin er et standard kjemoterapeutikum ved kreft terapi innen lymfe, hode og nakke tumorer, og testikkelkreft [38].

Det er estimert at så lite som ca. 500 molekyler av bleomycin i cytosol er nok til å drepe en celle. Endocytisk degradering bidrar likevel til at man må benytte høye doser for å oppnå ønsket effekt. Dette er et problem for bivirkningene av behandlingen. 50 % av bleomycin-behandlede pasienter er vist å utvikle pneumoniutbrudd og 3 % av disse dør [37]. Levering av bleomycin ved hjelp av PCI er vist svært effektivt og selektivt i flere tumormodeller og er nå under klinisk utprøving [23, 37].

1.3.2.2 *Toksiner og immunotoksiner*

Gelonin

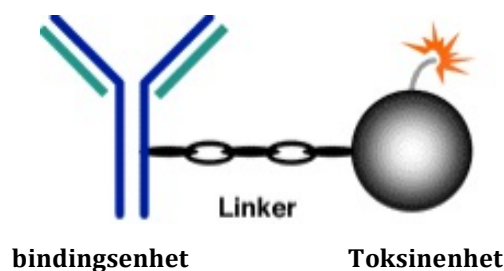
Toksiner fra planter kan deles inn i to typer. Type 1 toksiner består kun av en toksisk A-kjede, mens type 2 i tillegg har en cellebindende B-kjede. Type 1 toksiner er derfor generelt mindre toksiske enn type 2 toksiner [39]. Mange type-1 toksiner mangler i tillegg et domene for cytosolisk translokasjon etter opptak via endocytose. Dette gjør at disse type 1 toksinene er svært lite toksiske på hele celler, selv om de har lav IC₅₀ verdi i

cellefrie systemer [39]. PCI er vist å øke den cytotoksiske effekten av type 1 RIP'en Gelonin betydelig, og PCI av gelonin er også vist svært effektivt i flere tumormodeller i mus. 1-10 RIP molekyler i cytosol er nok for å drepe én celle [39]. Gelonin er et relativt lite protein (30 kDa) og kan ikke benyttes systemisk grunnet utskillelse i nyrene [40].

Gelonin baserte immunotoksiner- VEGFrGel

Antistoffer, cytokiner eller vekstfaktorer kan bindes til cytotoksiske komponenter (eks proteintoksiner), og forme et målrettet toksin [39].

Målrettede toksiner består derfor av to deler; en cellebindingsenhet og en proteintoksinenhet (figur 15). Bindingsenheten gjenkjenner celler som uttrykker et spesifikt kreft assosiert protein, mens toksinet utøver den cytotoksiske effekten [32]. Hvor spesifikt det målrettede proteintoksinet er, er avhengig av ekspresjon av antigenet som er uttrykt på kreftcellene, i forhold til ekspresjon på normale friske celler. Bruk av RIP- baserte målrettede toksiner i kreft behandling er en fordel, siden slike molekyler er lite toksiske på normal celler [39].



Figur 15: **Målrettede toksiner.** <http://www.1cro.com>, april 2014

PCI er vist å aktivere type 1 RIP baserte målrettede toksiner kun i det lyseksponerte vevet, ved å fotokjemisk frigjøre proteintoksinet gelonin inn i cellens cytosol og slik inhibere proteinsyntesen [39]. Målrettede toksiner som har vært benyttet har vært rettet mot epitelcelle adhesjons molekyler (EPCAM), human epidermal vekstfaktor (HER)-2, epidermal vekstfaktor reseptor (EGFR) og VEGFR [32]. VEGFR er overuttrykket i kreft endotelceller [32]. VEGF₁₂₁/rGel er et målrettet toksin som består av VEGF₁₂₁, endogen ligand for VEGFR og gelonin. VEGF₁₂₁/rGel er vist å inhibere tumorvekst i flere dyremodeller [41]. Få kurasjoner er, imidlertid, rapportert grunnet det relativt smale terapeutiske vinduet til VEGF₁₂₁/rGel. PCI av VEGF₁₂₁/rGel er nylig vist å gi ~ 50 %

kurasjon i mus med den aggressive tumormodellen CT26.CL25 [42]. PCI av VEGF₁₂₁/rGel skiller seg fra annen eksperimentell forskning på PCI av målrettede toksiner, siden VEGF₁₂₁/rGel er rettet mot tumorens vaskulatur og ikke mot tumorcellene [42].

PCI av immunotoksiner i fremtiden

PCI av målrettede toksiner har potensiale til å behandle flere typer kreft. Trastuzumab er et monoklonalt antistoff brukt i behandlingen av HER-2 positiv brystkreft. Legemiddelresistens er et stort problem ved Trastuzumab behandling, og mange pasienter opplever tumorprogresjon kort tid etter behandling. PCI av HER-2 målrettede toksiner ser ut til å ha god effekt, og kan ha en klinisk fremtid [32, 43].

VEGFR2 er en overflatereseptor som ofte er overuttrykket på overflaten av tumorendotelceller, og PCI av VEGF₁₂₁/rGel kan se ut til å være en viktig målrettet behandling [32].

Tumorinitierende celler, kalt kreft-stamceller er også et mulig fremtidig mål for PCI. Det er antatt at en unik populasjon av høyt resistente og maligne celler driver tumorprogresjon, og at en forutsetning for å kurere kreft, er å drepe alle kreft-stamceller i tumor. PCI av immunotoksiner målrettet til krefttumorceller kan være av stor interesse i fremtidig kreftbehandling [32].

1.3.3 PCI er svært selektivt og effektivt

En riktig kombinasjon av fotosensitiser, lys og legemiddel gjør PCI svært effektiv og selektiv innen kreftterapi. I motsetning til behandling med stråling eller cytostatika, kan PCI virke på celler som ikke deler seg. Dette kan være svært effektivt i behandling av kreft med hvilende maligne celler [23]. PCI behandling gir effekt i dypere lag av tumor enn i PDT, ca. 2 cm. Årsaken til dette er at PCI i tillegg frigjør et legemiddel i i cytosol som virker over et større området, slik at store deler av kroppens vev kan være tilgjengelig for behandling med en lavere lysdose enn benyttet ved PDT [40].

2 Materialer og metode

2.1 Cellelinje og dyrkningsmedium

I denne studien er forsøkene utført på brystkreftlinjen 4T1 fra ATCC (ATCC no. CRL-2539, mammary gland an animal stage Iv human breast cancer) ((American Type Culture Collection) Manassas, VA, USA).

4T1 ble dyrket i RPMI 1640-medium med L-glutamin og NaHCO₃ (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) supplert med 10 % FCS (føtalt kalveserum) (Fischer Scientific, USA) og 100 U/ml penicillin (Sigma-Aldrich). Cellene ble benyttet mellom passasje 2 og 25. Alt arbeid med celler ble utført aseptisk.

2.1.1 Hvorfor modellen ble valgt

4T1 celler er høyt tumorogene og invasive, og kan spontant metastasere fra primærtumoren i brystkjertelen til lymfeknute, blod, lever, lunge, hjerne og bein [44]. Den progressive spredningen av 4T1 til lymfeknuter og andre organer er diskutert å være veldig lik human metastaserende brystkreft [44]. Humane tumorceller metastaserer generelt dårlig i mus. Murine tumorceller derimot metastaserer mer effektivt og er mer lik de man observerer hos kreftpasienter [45], og derfor ble denne modellen brukt for å studere migrering etter behandling med PDT og PCI.

2.2 Splitting av celler

Cellene ble dyrket i monolagskultur i 75 cm² flasker (Nunc, Roskilde, Danmark) ved 37°C og 5 % v/v CO₂, og splittet 2-3 ganger per uke ved 80 % konfluensgrad (bestemt ved mikroskopi).

- Ved splitting av 4T1 celler ble mediumet først sugd av med en glasspipette, cellemonolaget vasket med 4 ml PBS (fosfat bufret saltvann) uten kalsium og

magnesium (Sigma-Aldrich), og tilsatt 2 ml trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) for at cellene skulle løsne. Flasken ble satt et par minutter i inkubatoren ved 37°C og flasken fikk et lite "dunk" på seg for at cellene lettere skulle løsne.

- Trypsin har proteaseaktivitet og kløyver proteinene som fester cellene til flaskeoverflaten, mens EDTA'en i trypsinet spalter bindingen mellom cellene og gir enkeltceller.
- Trypsinløsningen ble nøytralisert ved å tilsette 8 ml varmt dyrkingsmedium. Det ble ved mikroskopi sjekket at cellesuspensjonen besto av enkeltceller.
- Ønsket mengde med cellesuspensjon ble overført til nye 75 cm²-flasker med 18 ml medium.

2.3 Telling av celler for utsåing til forsøk

Etter trypsinering ble cellekonsentrasjonen bestemt ved å bruke et niruters tellekammer, Glasstic® slide 10 med grids-tellekammer (Hycor Biomedical Inc, CA, USA). 20 µl cellesuspensjon ble applisert i kammeret og satt under mikroskop. Tre diagonale ruter ble talt, og gjennomsnittlig celleantall ble beregnet. Hver av rutene har et volum på 0,1 µl, og derfor ble det gjennomsnittlige celleantallet multiplisert med 10 000 for å finne antall celler per ml.

2.4 Utsåing av celler

For prøveopparbeidelse til Western blotting med tilhørende viabilitetsmåling med MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) ble det sådd ut 250 000 celler per brønn i 6-brønnersbrett, 9,6 cm² (Nunc). Viabilitetsforsøkene etter PDT og PCI ble gjort med 5000 celler per brønn i 96-brønnersbrett, 0,33 cm² (Nunc). Til migreringsforsøket hvor incucyte ble benyttet ble det sådd ut 90 000 celler per brønn i 96 brønnersbrett, 0,33 cm². Til Boyden-kammer forsøket ble det sådd ut 9000 celler per Millicell® Cell culture Insert brønn (0,33 cm²) med 5 µm porer (Merck Millipore, USA). I 48-brønnersbrett (Nunc) ble det sådd ut 4500 celler per brønn som en kontroll på vellykket behandling i insert brønner.

2.5 Fotodynamisk terapi og Fotokjemisk internalisering

2.5.1 Lyskilde

I forsøkene med PDT og PCI brukte vi lyskilden LumiSource® (PCI Biotech AS, Oslo) som leverer blått lys. Arealet på lysbrettet er 45x17 cm, og lampen besto av fire 18 W Osram L 18/67 standard lystuber med en toppbølgelengde på 435 nm. Lampen hadde en stabil homogen lys intensitet over hele bestrålingsområdet og bestrålingen varierte med mindre enn 10% gjennom bestrålingsområdet, mens intensiteten var 15 % lavere i alle hjørner av lampen, enn resten av området. I forsøkene ble lampen slått på ca. 30 minutter før bestråling for at lampene skal stabilisere seg.

2.5.2 Fotosensitiser

I denne oppgaven ble fotosensitiseringen TPCS_{2a} (disulfonert tetrafenylklorin med to sulfonat grupper) (PCI Biotech) brukt i en konsentrasjon på 0,4 µg/ml [46]. TPCS_{2a} er en amfil fotosensitiser med en topp som absorberer lys ved 652 nm, og akkumuleres i endosomale og lysosomale membraner [47]. Etter at cellene ble behandlet med fotosensitiser, ble alt arbeid utført under med minst mulig lys for å unngå uønsket aktivering av fotosensitiseringen.

2.5.3 Makromolekyler

I PCI forsøkene brukte vi immunotoksinet VEGF₁₂₁/rGel (Baxter, Deerfield, IL) og toksinet gelonin. Gelonin er rekombinant laget (rGel) og var en gave til forskningsgruppen fra Dr Michael Rosenblum ved MD Anderson Cancer Center, Houston Texas.

2.5.4 Fotodynamisk terapi (PDT)

PDT er basert på lys, oksygen og fotosensitiser. Administrering av lys med en spesifikk bølgelengde vil aktivere fotosensitiseringen, og energien fra lyset overføres til molekylært oksygen og gir opphav til ROS.

Prosedyre

- Det ble sådd ut celler enten i 6- brønners, 48-brønners, 96- brønners eller i insert brønner avhengig av forsøk.
- 6 timer etter utsåing ble mediumet sugd av, og det ble tilsatt 0,4 µg/ml TPCS_{2a} i nytt medium. Cellene ble satt til inkubering i 18 timer i varmeskap før videre behandling.
- Dagen etter ble brønnene vasket 2 ganger med vekstmedium, og tilsatt nytt vekstmedium før videre inkubering i 4 timer.
- Etter 4 timers inkubering ble vekstmedium skiftet og cellene belyst med LumiSource®, før de ble satt tilbake i inkubatoren.
- Etter 48 timer ble celleviabiliteten målt med MTT- assay som beskrevet under punkt 2.6. Forsøkene ble utført 3 ganger med mindre noe annet er skrevet i resultatdelen.

2.5.5 Fotokjemisk internalisering (PCI)

PCI er en metode med utgangspunkt i PDT. Cellene blir i tillegg til fotosensitiseren inkubert med et makromolekyl (rGel eller VEGF₁₂₁/rGel). Fotosensitiseren TPCS_{2a}, og makromolekylet lokaliseres til endocytiske vesikler og lysosomer. Ved belysning av cellene, frigjøres makromolekylet ut i cytosol hvor de kan utøve effekt. "Lys etter"-strategien ble benyttet i denne oppgaven (se 1.3.1).

Prosedyre

- Det ble sådd ut celler enten i 6- brønners, 48-brønners, 96- brønners eller i insert brønner avhengig av forsøk.
- 6 timer etter utsåing ble mediumet sugd av, og det ble tilsatt 0,4 µg/ml TPCS_{2a}. Cellene ble satt til inkubering i 18 timer i varmeskap før videre behandling.
- Dagen etter ble brønnene vasket 2 ganger med vekstmedium, og rGel eller VEGF₁₂₁/rGel ble tilsatt til PCI brønnene, og kontrollbrønnene med toksiner. Når PCI forsøkene ble gjort med økende lysdoser ble cellene gitt enten 0,1 nM rGel i vekstmedium eller 0,1 nM VEGF₁₂₁/rGel i vekstmedium, med mindre annet er skrevet i resultatdelen. Når PCI forsøkene ble gjort med økende toksin/målrrettet

3 MATERIALER OG METODE

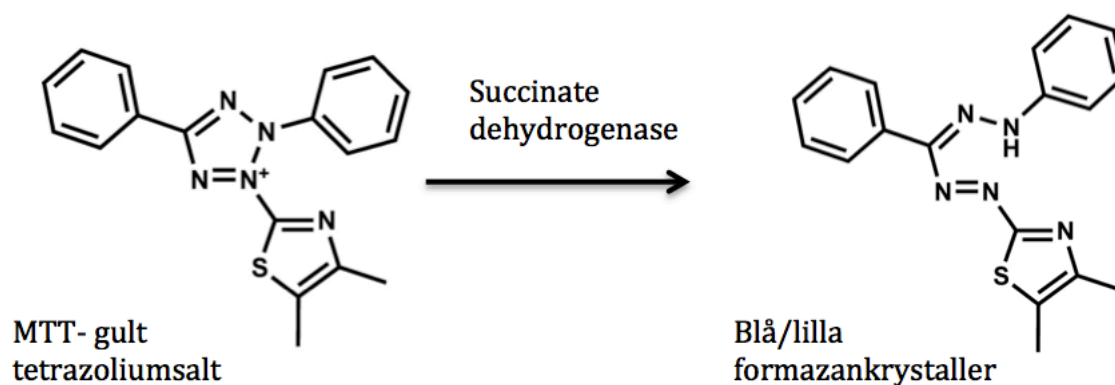
toksin konsentrasjoner ble cellene eksponert for 60-sekunders belysning, men med 0,001 nM, 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM og 100 nM rGel eller VEGF₁₂₁/rGel.

- Etter 4 timers inkubering med rGel eller VEGF₁₂₁/rGel ble vekstmediumet skiftet og cellene belyst med LumiSource®, før de ble satt tilbake i inkubatoren.
- 48 timer etter lys ble celleviabiliteten målt med MTT-assay som beskrevet under punkt 2.6. Forsøkene ble utført 3 ganger med mindre noe annet er skrevet i resultatdelen.

2.6 Mål på viabilitet- MTT-assay

MTT assay er et kvantitativt kolorimetrisk assay basert på en spaltningsprosess, hvor levende celler kan omdanne det gule tetrazoliumsaltet MTT til vannuløselig mørke blå/lilla formazankystaller. Resultatet vil være et mål på den mitokondrielle aktiviteten, siden omdanningen kun skjer i levende celler, av det mitokondrielle enzymet succinate-dehydrogenase. DMSO (dimetylsulfoksid) (Sigma-Aldrich) ble benyttet til å løse opp de mørke formazankrystallene. Absorbans av lilla løsning ble så målt med et spektrofotometer. Absorbansen vi leste av var relatert til antall metabolsk aktive celler i prøven, og ble lest av ved 570 nm. Jo flere metabolsk aktive celler i prøven, desto sterkere blå/lilla farge. Prøver ble analysert i 96- brønners-, 6 brønners- og 48 brønners brett.

Blankbrønner ble inkludert for å korrigere for bakgrunnsstøy. Blankbrønner var brønner uten celler tilstede, men kun medium+ MTT. Den reelle MTT absorbansen ble funnet ved å trekke blankverdien fra målt MTT absorbans i prøven.



Figur 16: *Illustrasjon av spaltningsprosessen.* <http://quoteko.com> , april 2014

Prosedyre

- Cellene ble behandlet med PDT og PCI som beskrevet under punkt 2.5.
- 48 timer etter belysning fortynnet vi stockløsningen av MTT (5 mg/ml MTT i PBS) til 0,25 mg/ml MTT i medium, tok bort cellemediumet i brønnene og pipetterte fortynnet MTT i brønnene hvor vi hadde celler tilstede. Blankbrønner ble inkludert.
- Platene ble inkubert ved 37°C i 4 timer. Klare lilla krystaller i bunnen av brønnene med celler ble observert.
- MTTén ble sugd av, og brønnene tilsatt DMSO slik at krystallene ble oppløst. Det ble målt absorbans på løsningen ved 570 nm i en multibrønn spektrofotometer plateleser (PowerWave XS2 microplate spectrophotometer), inkludert Gen5 programvaren (BioTek, Winooski, VT, USA).

2.7 Analyse av protein uttrykk ved SDS-PAGE/ Western blott

Western blott analyser er gjort for å studere uttrykket av proteinsignalering etter behandling, som kan være viktig for cellemigrering, og også for å studere ekspresjon av VEGF reseptorer i 4T1. I western blott analyser ble PAE celler transfektert med VEGFR1 og VEGFR2 (Gave fra professor Waltenberger, Universitetet i Münster, Tyskland) brukt som positive kontroller, for å studere ekspresjon av VEGF reseptorer i 4T1. Forsøkene ble utført 3 ganger, med mindre noe annet er skrevet i resultatdelen.

Generell oversikt over metoden:

1. Prøveopparbeidelse fra celler i kultur
2. Bestemmelse av relativ proteinmengde med DNA- måling
3. SDS-PAGE
4. Westernblotting
5. Immunodeteksjon
 - Inkubering med primærantistoff
 - Inkubering med sekundærantistoff
6. Bildebehandling av Western blott
7. Kvantifisering/ loading kontroll av Western blott

2.7.1 Prøveopparbeidelse

Prøveopparbeidelse av PDT- og PCI behandlede celler ble gjort 30 min etter belysing, mens prøveopparbeidelsen til bestemmelse av VEGFR uttrykkelse ble gjort i 80% konfluente 25 cm² flasker. Under prøveopparbeidelsen ble cellene høstet, og lysert med Lane Marker Reducing Sample Buffer (1x) (Thermo Scientific, USA) (vedlegg A) slik at målproteinet ble gjort tilgjengelig for SDS-PAGE.

Prosedyre

- Celler ble satt på is for å stoppe videre cellulære prosesser.
- Mediet ble sugd av, og det ble tilsatt 1 ml iskald PBS med kalsium og magnesium (Sigma-Aldrich). Brønnene ble vippt forsiktig for å få en god vask.
- PBSén ble sugd av, og 70 µl lyseringsbuffer, "Lane Marker Reducing Sample Buffer" ble tilsatt til brønnene i 6-brønners brett og 500 µl ble tilsatt 25 cm² flaskene.
- Lysatene ble skrapet sammen ved hjelp av en celleskrape, og overført til 1.5 ml plastikk eppendorfrør (SARSTEDT, Nümbrecht, Tyskland), sonikert og lagret i -80 fryseren.

2.7.2 Bestemmelse av relativ proteinmengde med DNA måling

For å kunne sammenlikne uttrykk av et protein i forskjellige prøver må den totale proteinmengden som undersøkes være lik for alle prøver. Appliseringsvolumet av hver prøve på gelen må derfor gjenspeile total proteinmengde for prøvene. Vi måler absorbansen ved 260/230 nm (DNA) i prøvene våre før applisering. Absorbansen gav oss et direkte mål på DNA mengde i prøvene som vi kan bruke for å justere appliseringsvolumet, slik at DNA- innholdet i hver prøve blir tilnærmet lik. Vi gikk ut fra et en lik applisert DNA mengde ville bety en lik applisert protein mengde.

Prosedyre

- Eppendorfrør fra prøveopparbeidelsen ble tatt opp av fryseren, og tint.

3 MATERIALER OG METODE

- Den rosa fargen i lyseringsbufferen absorberer lys ved 260/230 nm, og derfor må vi korrigere for det. Vi laget en blank-verdi av lyseringsbuffer i fortynning 1:50 med ddH₂O (490 µl ddH₂O og 10 µl lyseringsbuffer).
- Prøvene ble fortynnet 1:25 med ddH₂O (480 µl ddH₂O og 20 µl prøve).
- Kyvetten ble først vasket med metanol (Sigma-Aldrich) før bruk.
- Kyvetten ble så vasket 2 ganger med blank-løsning, og nullstilt med 90 µl blank løsning.
- For hver prøve ble kyvetten vasket 2 ganger med 90 µl prøve, før det ble tilsatt 90 µl prøve i kyvetten for måling. Hver prøve ble analysert 3 ganger.
- Gjennomsnittlig DNA mengde for de tre parallellene ble beregnet, og appliseringsvolumene beregnet. Det maksimale appliseringsvolumet på gelene er 15 µl, og derfor fikk prøven med lavest absorbans et appliseringsvolum på 15 µl. Appliseringsvolumet til de andre prøvene ble bestemt fra lysatløsningen med minst DNA, med denne formelen:

$$\frac{15 \text{ mikroliter} \times \text{lavest gjennomsnittabsorbans}}{\text{gjennomsnittlig målt absorbans av prøven}} = \text{appliseringsvolum for prøven}$$

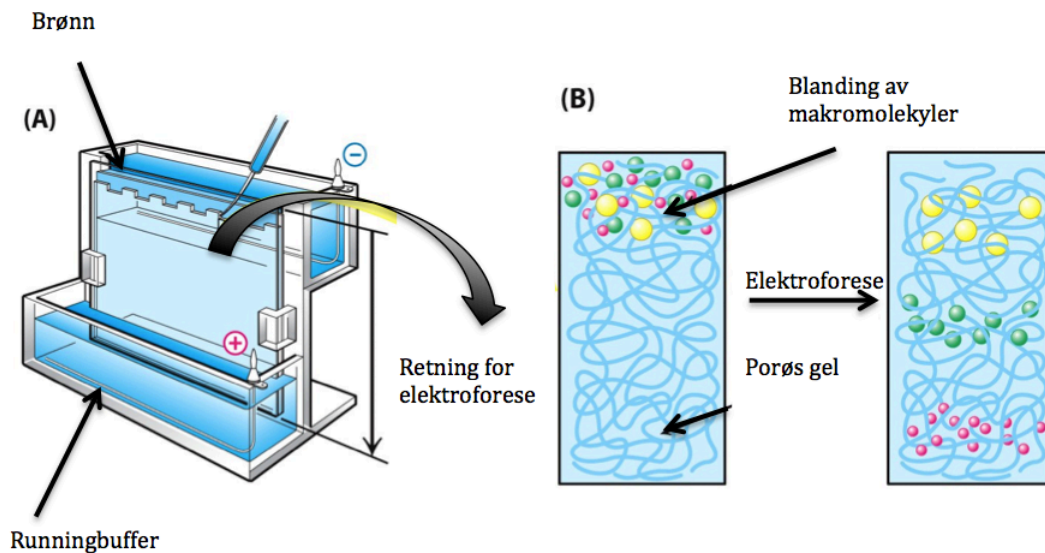
2.7.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE er en teknikk basert på at ladde molekyler migrerer etter størrelse i en gelmatriks i respons til et elektrisk felt. Ved hjelp av denne teknikken kan man separere proteiner med ulik molekylær vekt. Proteinene, kan videre detekteres ved hjelp av antistoffer. I lyseringsbufferen var det tilsatt en anionisk detergent, sodium docedyl sulfate (SDS), som ødelegger proteinfoldingen og gjør proteinene negativt ladet. Dette gjør at proteiner med tilnærmet lik molekylvekt migrerer likt. Ved å varme opp prøvene til 95°C skjer en dissosiering av inter- og intrakjede disulfidbindinger, i nærvær av det reduserende agenset dithiotreitol (DTT) som er tilsatt i lyseringsbufferen. Slik mister proteinene den tredimensjonale strukturen, slik at de kan separeres gjennom gelen. SDS vil også coate de lineære proteinene med en negativ ladning som er proporsjonal med proteinmassen.

3 MATERIALER OG METODE

Polyakrylamid gel 4-20 % Tris-HCl med 15 brønners applisering (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ble brukt, og er en separerende gel hvor proteinene beveger seg gjennom gelen.

På gelen ble det også applisert en standard proteinstige som gav fargede bånd i forskjellige molekulstørrelser. Disse båndene viste hvordan proteinene migrerte på gelen, og gav en pekepinn på hvor det ønskete proteinet kunne detekteres.



Figur 17: *Illustrasjon av oppsett for SDS-PAGE: Proteiner med ulik størrelse vandrer med ulik hastighet gjennom polyakrylamid gel.* Modifisert figur fra <http://www.imb-jena.de>, april 2014

Prosedyre

- En standard protein stige av 6 µl lyseringsbuffer, 3 µl Kaleidoskop (Bio-Rad) og 3 µl Biotinylert ladder (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) (vedlegg B) ble laget.
- I eppendorfrør med både cellelysat og stige, ble det stukket hull, og rørene ble kokt ved 95°C i 5 minutter.
- Eppendorfrørene ble så satt på is, vortexet og spunnet ned.
- Gelapparatet ble montert og det indre kammeret ble fylt helt opp med 1 x Runningbuffer (BioRad), og det ytre kammeret fylt opp til merket "2-geler" eller "4-geler" (vedlegg A). Brønnene ble skylt med Runningbuffer ved pipettering for å være sikker på at gelen og brønnene var hele, og at det ikke var noen gel- rester eller luftbobler igjen i brønnene.

3 MATERIALER OG METODE

- 10 µl av standard protein stige-løsningen ble applisert i den første brønnen.
- Deretter ble appliseringsvolumene vi beregnet for de ulike prøvene applisert, slik at vi fikk like proteinmengder applisert i hver brønn på gelen. I de tomme gel-brønnene ble det applisert 15 µl 1 x lyseringsbuffer fortynnet 1:1 i ddH₂O.
- Gelelektroforesen ble kjørt på is ved 200 V i ca. 30 minutter, til fronten med lyseringsbuffer hadde gått helt ned til enden av gelen.

2.7.4 Western Blotting

Western blott er en metode brukt til å overføre proteinene fra polyakrylamidgelen og over til en membran, ved hjelp av elektrisk spenning. Proteinene blir dyttet fra gelen og over på membranen. Etter at proteinene er separert på en gel ved SDS-PAGE, må de overføres til en nitrocellulose- eller polyvinylidendifluorid (PVDF) membran for spesifikk deteksjon av proteiner. Antistoffer kan ikke benyttes på proteiner i en gel, og derfor måtte proteinet blottes over på en membran. Hybond-P PVDF-membraner fra Amersham Biosciences, (Amershamplace, UK) ble benyttet.

Prosedyre

- Det ble klippet av en membranbit på størrelse med gelen, og det ble laget et kutt på siden for å markere hvor brønn 1 var.
- Membranen ble dynket i metanol og lagt i transferbuffer. 2 filterpapir og 2 svamper ble også fuktet i transferbuffer.
- Gelplaten ble fjernet fra Gel apparatet. Ved bruk av en gelskjærer kuttet vi av den delen av gelen hvor brønnen var, slik at vi kun satt igjen med separeringsgelen. Gelen ble løsnet fra plastplaten og lagt i transferbuffer.
- I kassetten til transferkammeret ble svamp- filter- gel-membran- filter- svamp lagt lagvis (alt dynket i transferbuffer), og kassetten satt sammen. Deretter rullet vi ut luftbobler fra kassetten. Kassetten ble plassert i transferkammer med en isblokk på siden, og en magnet ble tilsatt. Beholderen ble fylt opp med transferbuffer.
- Western blotting ble kjørt ved 100 V i 2 timer ved 4°C.

Etter Western blotting var proteinene på undersiden av membranen (den delen som lå nærmest gelen).

2.7.5 Immunodeteksjon

Det neste trinnet var å detektere proteinene med antistoff. Membranen kan binde antistoff uspesifikt, og før inkubasjon med primært antistoff måtte membranen blokkeres med 5 % skummetmelk for å unngå uspesifikke bindinger. Etter blokkering ble membranen inkubert med et primært antistoff som bindes spesifikt til det aktuelle antigenet/proteinet på membranen, og deretter et sekundært antistoff som bindes til det primære antistoffet.

Prosedyre

- 12 ml 1 x TTBS (vedlegg A) ble pipettert over i et 50 ml rør.
- Membranen ble lagt med proteinsiden vendt innover i røret.
- Membranen ble så blokkert med 15 ml 5% w/v skummetmelk (Sigma-Aldrich) i 1 time i romtemperatur på rulle. Melkeproteinene metter membranen og gjør at antistoffene ikke fester seg generelt til hele membranen, men til proteinene man ønsker å detektere på membranen. Etter 1 time ble membranen inkubert med fortynnet antistoff i 5% w/v bovint serumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich), eller 5 % w/v skummetmelk ved 4°C over natt på rulle (vedlegg B).
- Neste dag ble membranen vasket 3 ganger med 12 ml 1 x TTBS med 5-minutters rulling for å fjerne ubundet primært antistoff.
- Deretter ble membranen inkubert med et sekundært antistoff fortynnet i 5 ml 5% w/v skummetmelk som binder seg til Fc- regionen av det primære antistoffet, (vedlegg B). Et antistoff mot biotin ble også tilsatt for å detektere stigen (vedlegg B).

2.7.6 Bildebehandling av Western blott

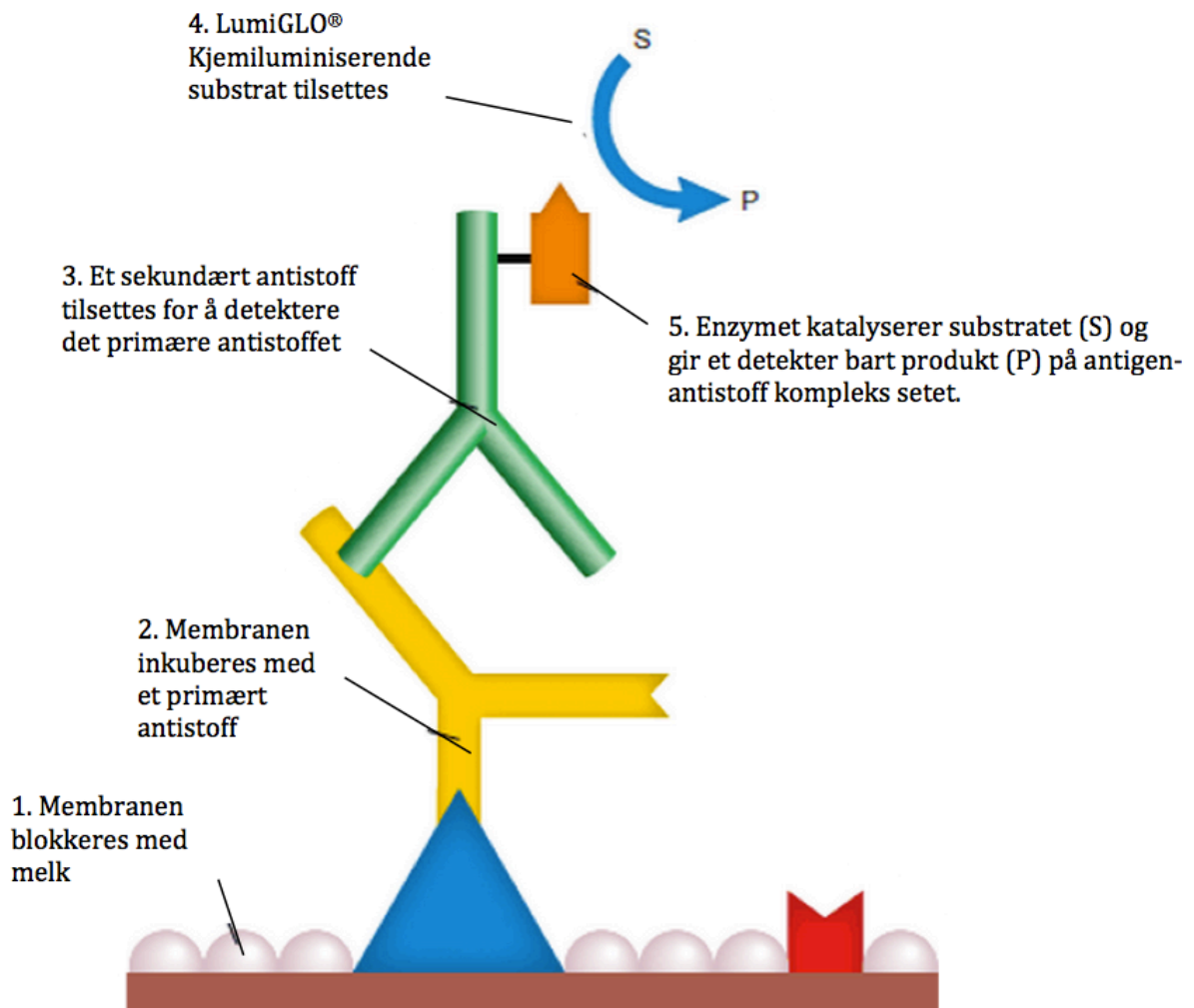
Fc- delen av det sekundære antistoffet var konjugert med horseradish peroxidase (HRP). Dette enzymet kan katalysere oksideringen av luminol og føre til emmisjon av lys. Dette lyset kan fanges opp (chemiluminiscens), og vil være et mål på mengde målprotein på

3 MATERIALER OG METODE

membranen. LumiGLO® Kjemiluminiserende substrat system (KPL, Gaithersburg, MD, USA) ble brukt for deteksjon av protein på membranen.

Prosedyre

- Etter 1 time rulling med sekundært antistoff ble membranen vasket 3 ganger med 12 ml 1 x TTBS med 5 minutters rulling i romtemperatur.
- Membranen ble inkubert med 250 µl LumiGLO® A og 250 µl LumiGLO® B for 5 minutter i romtemperatur.
- Etter inkubering ble overskuddsvæsken fjernet ved å løfte opp membranen og holde kanten mot et papir. Membranen ble lagt mellom to transparente ark og teipet fast på sidene. Det var viktig å ta av overflødig væske. Membranene ble fotografert med ChemiDoc™ densitometer (Bio-Rad), og programvaren ImageLab 4.1 (Bio-Rad) ble brukt for digital prosessering av proteinbånd.



Figur 18: *Illustrasjon av antistoff binding og deteksjon på Western blott: Etter at membranen er blokkert med skummetmelk, inkuberes membranen med et primært antistoff som bindes spesifikt til det aktuelle antigenet/proteinet på membranen, så et sekundært antistoff som bindes til det primære antistoffet. Fc-delen av det sekundære antistoffet er konjugert med enzymet HRP, som gir en spesifikk enzymatisk detektering av membran bundne antigen hvor substratet reagerer og danner lys.* Modifisert figur fra <http://www.bio-rad.com>, mai 2014

2.7.7 Loading kontroll

Når vi gjør Western analyse er det viktig med en kontroll over appliseringsvolumene. Vi har brukt gammatubulin (Sigma-Aldrich) med en molekylvekt på 48 kDa.

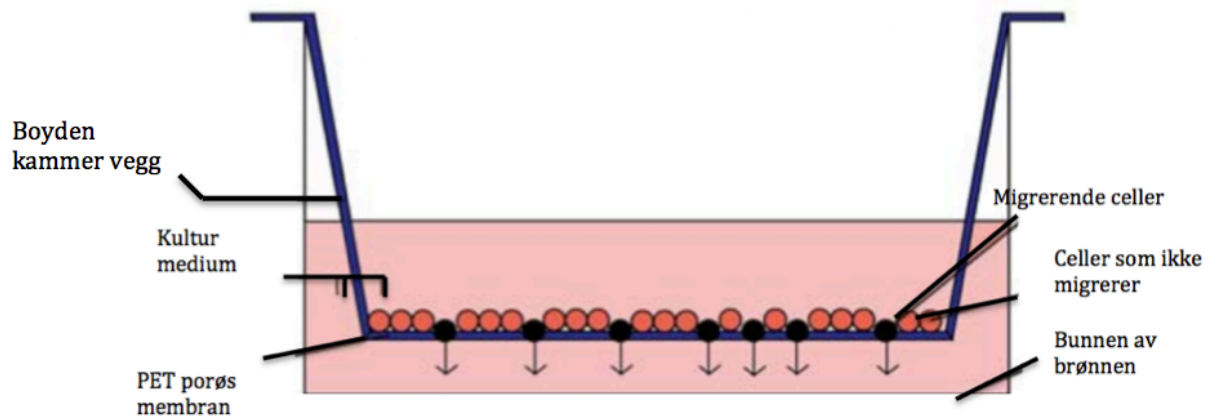
Prosedyre

- Etter deteksjon med LumiGLO®, ble membranen puttet i et nytt 50 ml rør og vasket 3 ganger med 12 ml 1 x TTBS med 5 minutters rulling i romtemperatur.
- Membranen ble inkubert med det primære antistoffet gammatubulin fortynnet i 5% w/v skummetmelk, ved romtemperatur i 1 time på rulle (vedlegg B).
- Deretter ble membranen vasket 3 ganger med 12 ml 1 x TTBS med 5-minutters rulling for å fjerne ubundet primært antistoff.
- Så ble membranen inkubert med et sekundært antistoff fortynnet i 5 ml 5% w/v skummetmelk som binder seg til Fc- regionen av det primære antistoffet, og et antistoff mot biotin for å detektere stigen i 1 time i romtemperatur på rulle (vedlegg B).
- Bildebehandlingen var lik som beskrevet under 2.7.6

2.8 Migreringsassay ved bruk av Boyden-kammere

Cellenes migreringspotensial kan bestemmes ved bruk av Boyden- kammer. Dette er et plastikkammer som har en porøs membran i bunnen. Dette kammeret ble plassert i en 48 brønners plate. Cellene ble sådd ut i kammeret, og vi undersøkte cellenes evne til å migrere gjennom porene og ned på undersiden av porene og ned i brønnen under.

Boyden- kammer oppsettet består av to deler separert av en porøs membran som er en slags barriere for cellepenetrasjon. Forsøket ble utført både med og uten serumgradient, for å både studere generell migrering og migrering mot en konsentrasjonsgradient. Forsøkene ble utført 3 ganger med mindre noe annet er skrevet i resultatdelen.



Figur 19: *Illustrasjon av oppsettet for Boyden kammer: Celler blir sådd ut på den porøse membranen og kan med tid migrere gjennom membranen og ned i brønnen under.* Modifisert figur fra Oppegard *et al.* [48].

2.8.1 Studier av cellemigrering med Boyden-kammer etter PDT og PCI

2.8.1.a) Fotodynamisk terapi og fotokjemisk internalisering uten serumgradient

- Det ble sådd ut 100 μ l celleduspensjon i insert brønnene, og på undersiden ble det pipettert 700 μ l RPMI- medium med serum og Penicillin.
- 6 timer etter utsåing ble mediumet sugd av både oppe og nede, og tilsatt 0,4 μ g/ml TPCS_{2a} i vekstmedium, herav 100 μ l i insert brønnen, og 700 μ l i 48-brønnersbrettet under insert brønnen. Det ble gjort et viabilitetsforsøk (MTT) parallelt i et 48-brønners brett. Cellene ble satt til inkubering i 18 timer i varmeskap før videre behandling.
- Dagen etter ble både insert brønnene og de vanlige brønnene vasket 2 ganger med 100 μ l og 700 μ l PBS (med kalsium og magnesium). Det ble tilsatt nytt frisk vekstmedium i PDT brønnene og de ubehandlede brønnene. I PCI- og kontrollbrønnene ble det tilsatt 0,1 nM VEGF₁₂₁/rGel i vekstmedium.
- Cellene ble inkubert i 4 timer i varmeskap for "chasing" av fotosensitiseren inn i cellene.

3 MATERIALER OG METODE

- Etter 4 timer ble mediumet sugd av både oppe og nede, og det ble gitt et nytt friskt medium. Deretter ble det gitt ønsket lysbehandling ved hjelp av LumiSource®, og cellene ble satt tilbake i inkubatoren.
- Etter 48 timer ble celleviabiliteten målt med MTT-assay.

Det ble tilsatt 100 µl MTT i vekstmedium i insert brønnene, og 700 µl under insert brønnene.

Etter at det stod til inkubering i 4 timer, sugde vi av MTTén både oppe og nede, og tilsatte DMSO over og under membranen. Absorbans fra MTT i løsningen over og under membranen, ble målt hver for seg.

Væsken i insert brønnen ble pipettert over i 96 brønnersbrett før måling av absorbans. Absorbansen fra insertbrønnen gav oss et mål på celler som har migrert. Den migrerte fraksjonen ble beregnet ved å dividere absorbansen lest under insert brønnen på sumabsorbansen.

Sumabsorbans = Absorbans i insert brønnen + absorbans under insert brønnen

$$\text{Migrert fraksjon} = \frac{\text{absorbans lest under insert brønnen}}{\text{sumabsorbans}}$$

2.8.1 b) Fotodynamisk terapi og fotokjemisk internalisering med serumgradient

- Prosedyren i 2.8.1 a ble fulgt til rett før lyseksponering.
- Etter 4 timers inkubering (chasing av fotosensitiser) ble det tilsatt RPMI-medium med serum (10%) under insert brønnen, og RPMI-medium uten serum i insert brønnen.
- Etter lysbehandling med LumiSource®, ble cellene satt tilbake i inkubatoren.
- Etter 48 timers inkubering ble celleviabiliteten målt med MTT-assay som beskrevet under punkt 2.8.1 a.

Før tilsetning av MTT, skrapte vi av innsiden av insert brønner med en bomullsdott, slik at vi fjernet alle celler som ikke hadde migrert over på den andre siden, og kunne være sikker på at vi bare målte absorbanse av migrerte celler.

- Videre er prosedyren lik som PDT og PCI uten serumgradient. Det ble fremdeles lest av absorbanse i insert brønner selv om det ble brukt en bomullsdott for å fjerne alle celler. Forsøket uten serum viser oss at de cellene som overlever migrerer, og at forsøket med serumforskjell viser oss at cellene også migrerer med en konsentrasjonsgradient.

2.9 Migrering av 4T1 celler ved sårhelingsassay

Et sårhelingsassay ble brukt for å studere evnen 4T1- celler har til å migrere.

Rett etter og 24 timer etter PDT og PCI ble et snitt av cellemonolaget skrapet av med en 96-pinner "celleskraper" (WoundMaker®) (Essen BioScience Cellplayer, USA). I starten av sårhelingsassay-forsøk ble sårene laget manuelt med en "celleskraper/kanyle, men dette skadet cellemonolaget, og gav heller ingen presise og reproducerbare sår. En 96-brønners WoundMaker danner en cellefri sone i cellemonolaget, og lager presise og reproducerbare sår i alle brønner ved å forsiktig fjerne cellene fra det konfluente cellemonolaget. Når platen ble plassert i WoundMakeren, tok prosessen kun få sekunder.

Platene ble så satt inn i incucyten (Essen BioScience Cellplayer) for å studere migreringspotensialet. Incucyte er et mikroskop lokalisert i en inkubator og er spesielt godt egnet til langsiktig overvåking av cellevekst.

Incucyten ble brukt til å ta bilder av cellene ved ulike tidspunkter etter behandling. Bilder ble tatt umiddelbart etter at platene ble satt inn, og hver 3. time i noen påfølgende døgn.

Prosedyre

- Cellene ble behandlet med PDT og PCI i 96-brønners brett som beskrevet under punkt 2.5.

- Ved cellemigrering rett etter lys, ble "celleskrapen" brukt til å lage et sår rett før belysning.
 - Etter sårlaging, ble brønnene vasket 1 gang med vekstmedium, belyst, og satt inn i incyten.
- Ved cellemigreringsstudien 24 timer etter lys, ble "celleskrapen" brukt til å lage sår 24 timer etter belysning.
 - Etter sårlaging ble brønnene vasket 1 gang med vekstmedium og satt inn i incyten.
- Alle forsøk ble utført 2 ganger og må reproduseres.

2.10 Inhibering av signalveier som kan være av betydning for overlevelse

P38 hemmeren SB203580 (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Tyskland) ble benyttet for å studere om p38 aktivering hadde noen effekt på overlevelse etter PDT og PCI.

Prosedyre:

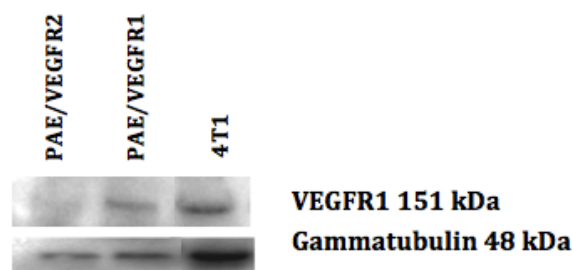
- Cellene ble behandlet med PDT og PCI for viabilitetsmåling i 96-brønners brett som beskrevet under punkt 2.5 frem til 3 timers "chasing".
- Etter 3 timers "chasing", ble cellene inkubert i 1 time med 20 mM SB203580, belyst med hemmer tilstede, og videre inkubert i 2 timer til.
- Deretter ble hemmeren fjernet, og det ble tilsatt nytt friskt vekstmedium, og platene inkubert videre i 48 timer, før det ble gjort MTT som beskrevet under punkt 2.6.
- Forsøket ble utført 1 gang, og må reproduseres.

3 Resultater

3.1 PDT- og PCI behandling

3.1.1 Cellulær overlevelse etter PDT og PCI med økende lysdoser

Denne studien ble utført på 4T1 celler. 4T1 celler er tidligere vist å være metastaserende i mus og ha god evne til å migrere *in vitro* [44]. PCI av VEGF₁₂₁/rGel er vist selektivt for både VEGFR1 og VEGFR2 [41]. Western blott av VEGFR1 viste ekspresjon av VEGFR1 i 4T1 (figur 20). Western blott av VEGFR2 viste ingen ekspresjon av VEGFR2 i 4T1 (resultatet ikke vist).

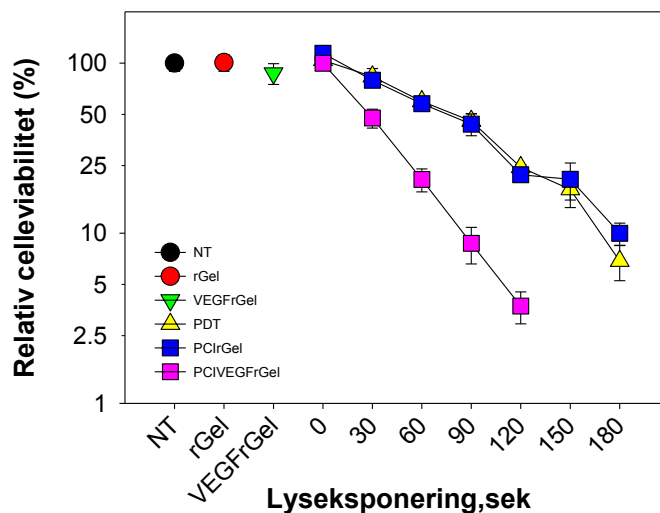


Figur 20: **VEGFR1 uttrykkelse i 4T1:** Western blott av VEGFR1 i 4T1. PAE/VEGFR1 er VEGFR1 transfekterte PAE celler (positiv kontroll). PAE/VEGFR2 er VEGFR2 transfekterte PAE celler (negativ kontroll). Gammatubulin viser loading. Forsøket er utført 1 gang.

Sensitiviteten til 4T1 for PDT og PCI av VEGF₁₂₁/rGel ble undersøkt med MTT viabilitetsassay. Forsøkene viste at den cytotoksiske effekten økte med økende lysdoser både i PDT- og PCI behandlede celler, men at en høyere lysdose måtte til for å oppnå samme effekt i PDT som i PCI av VEGF₁₂₁/rGel behandlede celler. 50 % drap ble oppnådd ved 30 sekunder lys for PCI av VEGF₁₂₁/rGel, mens 90 sekunder lys gav tilsvarende effekt for PDT. PCI av rGel gav tilsvarende effekt som PDT og viser at PCI av VEGF₁₂₁/rGel er selektivt for VEGFR1. Viabiliteten i rGel behandlede celler var høyere

3 RESULTATER

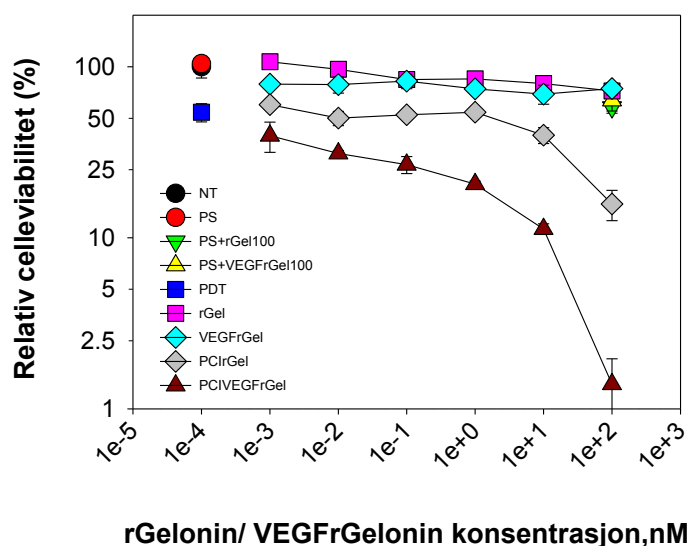
enn i VEGF₁₂₁/rGel behandlede, og dette tyder også på at VEGF₁₂₁/rGel taes opp spesifikt via VEGFR1 (Figur 21).



Figur 21: **Cellulær overlevelse etter behandling med PDT og PCI av 0.1nM toksin/måltrettet toksin med økende lysdose:** Relativ cellelevabilitet er plottet som funksjon av lysdose. NT: ingen behandling. PS: TPCS_{2a}-behandling. Dette er et representativt forsøk, og resultatene er gjennomsnitt av tre paralleller. Errorbarene viser standard avvik.

3.1.2 Cellulær overlevelse etter PDT og PCI med økende toksin konsentrasjoner

PCI ble også utført med økende konsentrasjoner av toksiner. En lysdose på 60 sekunder ble valgt. Denne lysdosen gav ~40 % drap med PDT. Lite mørketoksisitet ble observert i forsøkene. Den relative cellelevabiliteten ble redusert med økende VEGF₁₂₁/rGel konsentrasjoner og 60 sekunders belysning. En høyere rGel konsentrasjon i kombinasjon med PCI måtte til for å oppnå samme reduksjon i viabilitet som ved PCI av VEGF₁₂₁/rGel. 80 % drap ble oppnådd med PCI av 100 nM rGel mens bare 0,1 nM VEGF₁₂₁/rGel var nødvendig for samme effekt. Resultatene indikerer derfor at PCI av VEGF₁₂₁/rGel er selektivt for VEGFR1 i 4T1 celler (figur 22).



Figur 22: *Cellulær overlevelse etter PDT- og PCI behandling med økende toksinkonsentrasjoner:* Relativ cellelevabilitet er plottet som funksjon av toksinkonsentrasjon. NT: ingen behandling. PS: TPCS_{2a}-behandling. Dette er et representativt forsøk, og resultatene er gjennomsnitt av tre paralleller. Errorbarene viser standard avvik.

3.2 PDT- og PCI behandlede cellers evne til å migrere; ved Boyden-kammer analyser

Boyden-kammere ble benyttet for å måle migrasjon av 4T1 celler etter PDT og PCI. Forsøket ble utført både med og uten serumgradient, for å både studere generell migrering og migrering med en konsentrasjonsgradient. I forsøk med serumgradient studeres cellenes evne til å migrere fra insert brønnen som ikke er tilsatt serum, og ned på undersiden av porene og i brønnen under som er tilsatt serum.

3.2.1 Migrering uten serumgradient

Celler ble sådd ut i insert brønn og behandlet med PDT og PCI. MTT ble både tilsatt i insert brønn og brønnen under, og absorbansen for disse brønnene ble målt hver for seg.

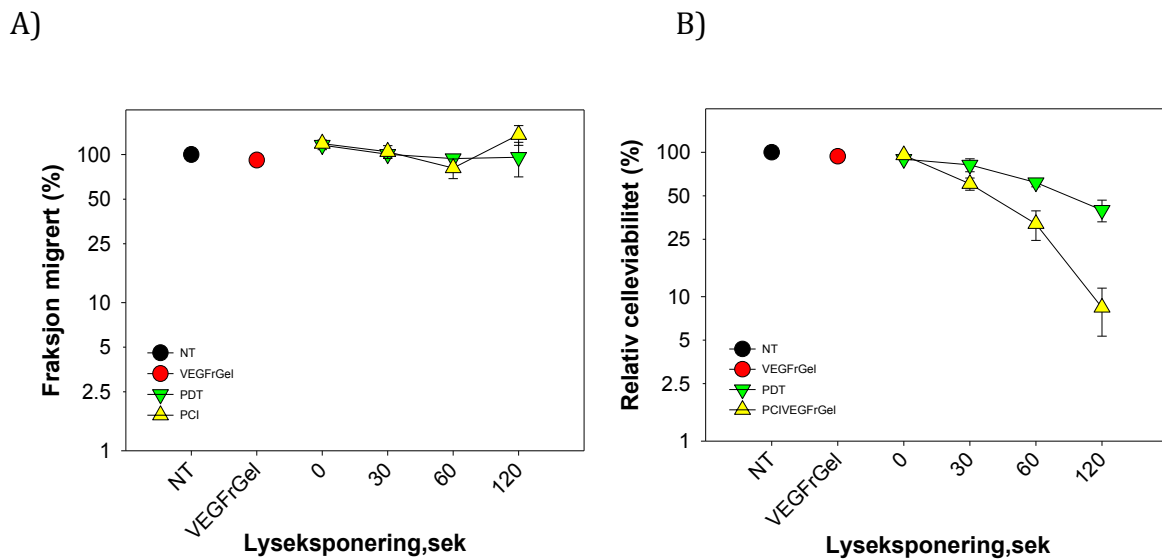
3 RESULTATER

Sumabsorbans = Absorbans i insert brønnen + absorbans under insert brønnen

$$\text{Migrert fraksjon} = \frac{\text{absorbans lest under insert brønnen}}{\text{sumabsorbans}}$$

Den migrerte fraksjonen forandret seg ikke signifikant med økende lysdose i PDT- eller PCI behandlede celler. Det ble heller ikke funnet noen forskjell i migrert fraksjon mellom PDT og PCI (figur 23A). Resultatet kan derfor tolkes slik at celler som overlever behandlingene kan migrere over membranen.

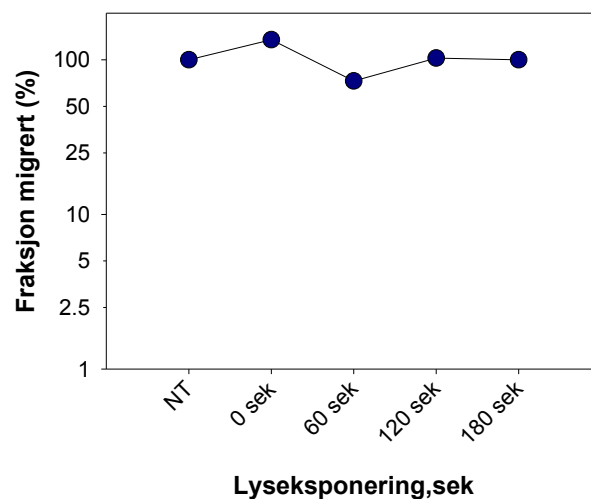
Sumabsorbansen viste at den relative celleoverlevelsen sank med økende lysdoser for PDT- og PCI behandlinger i Boyden kammere, som beskrevet for behandlingene i 96 brønners brett (Figur 21). 50 % drap ble oppnådd ved 45 sekunder lys for PCI av VEGF₁₂₁/rGel, mens 120 sekunder lys ga tilsvarende effekt for PDT (figur 23B).



Figur 23A og 23B: **A) Fraksjon migrert celler (fraksjon MTT-absorbans under insert brønn) etter PDT og PCI av 0.1nM VEGF/rGel med økende lysdose i Boyden-kammer:** Migrert fraksjon er plottet som funksjon av lysdose. NT: ingen behandling. Dette er et representativt forsøk, og resultatene er gjennomsnitt av tre paralleller. Errorbarene viser standard avvik. **B) Relativ celleviabilitet (summen av MTT-absorbans over og under insert brønn) etter PDT og PCI av 0.1nM VEGF/rGel med økende lysdose i Boyden-kammer:** NT: ingen behandling. Dette er et representativt forsøk, og resultatene er gjennomsnitt av tre paralleller. Errorbarene viser standard avvik.

3.2.2 Migrering med serumgradient

En serumgradient ble benyttet i Boyden- kammer forsøkene for å studere om PDT virket på cellenes evne til å bevege seg med en konsentrasjonsgradient. Gradienten ble tilført rett før belysning, ved å erstatte det serumholdige mediumet i insert brønnen med serumfritt medium, og beholde medium med serum under insertbrønnen. Den migrerte fraksjonen forandret seg ikke signifikant med økende lysdose i PDT. Forsøket ble kun utført med PDT. MTT resultatet til dette forsøket foreligger ikke. Resultatet indikerer at celler som overlever behandlingene migrerer med en serumgradient



Figur 24: *Fraksjon migrert celler (fraksjon absorbans under insert brønn) med serumgradient etter PDT med økende lysdose i Boyden-kammer: Migrert fraksjon er plottet som funksjon av lysdose. Resultatet er gjennomsnitt av tre paralleller. Errorbarene viser standard avvik. Forsøket er utført 1 gang.*

3.3 PDT- og PCI behandlede cellers evne til å migrere; sårhelingsassay

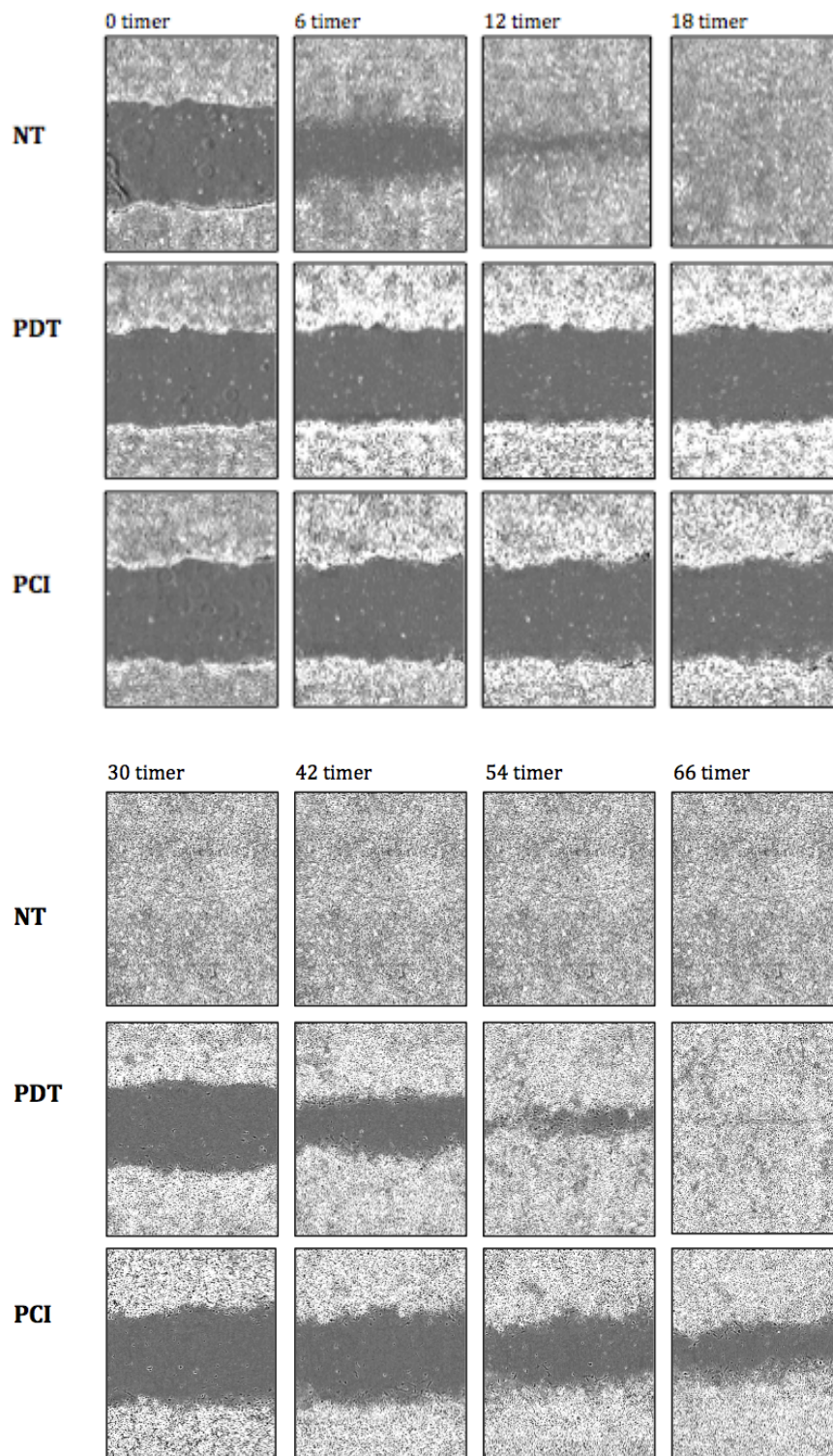
Et sårhelingsassay ble også benyttet for å studere cellers evne til migrasjon etter PDT og PCI. Migrasjonen ble studert både i tidsrommet rett etter belysning (0-66 timer etter lys) og i tidsrommet fra 24 timer etter lys (24-73 timer etter lys). PDT dosen som ble benyttet (90 sekunder lys) reduserte viabiliteten til 50 % etter PDT og 10 % etter PCI (MTT 48 timer etter lys, figur 21). Det ble brukt samme oppsett i 96-brønners brett som i figur 21, men med økt cellekonsentrasjon. MTT resultatet til dette forsøket foreligger ikke, men resultatet viser at behandlingene har virket. Sårheling ble studert ved hjelp av fotografering med en incucyte.

3.3.1 Cellemigrering rett etter behandling

Migrering av 4T1 i tidsrommet rett etter behandling ble studert ved å lage et sår i monolaget umiddelbart før belysning (figur 25). Bildene viste at de ubehandlede cellene migrerte sammen i løpet av 18 timer. Migreringen var hemmet i PDT- og PCI behandlede celler de første 30 timene etter lys. PDT behandlede celler startet så å migrere og sårhelingen var ferdig ved 66 timer etter lys. For PCI behandlede celler var migreringen hemmet i 42 timer etter lys. Sårhelingen var detektert ved 54 timer, men var ikke fullstendig ved 66 timer da eksperimentet ble avsluttet.

3 RESULTATER

Migrering rett etter behandling:



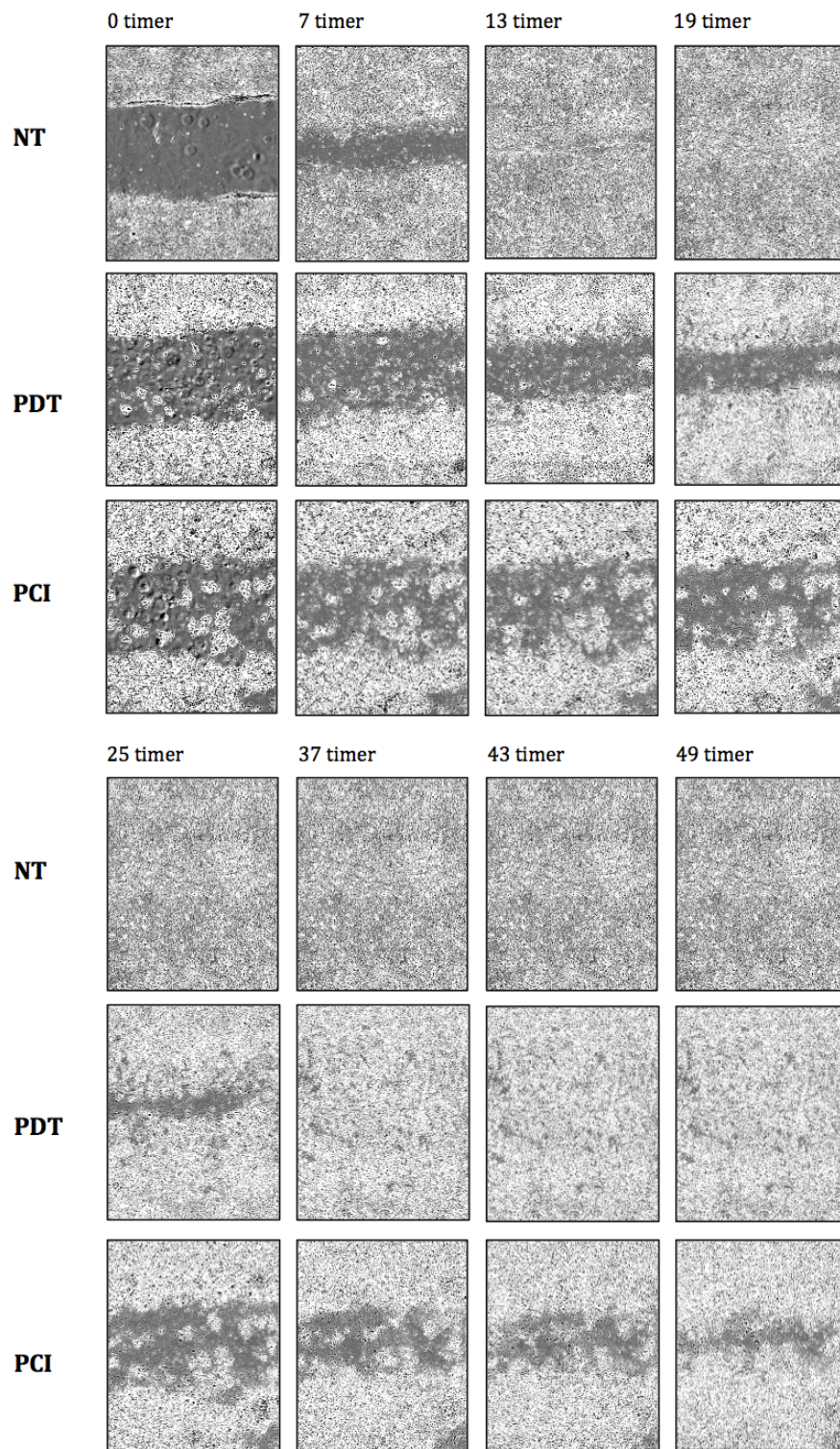
Figur 25: **Migrering av celler 0-66 timer etter PDT og PCI; Sårhelingsassay:** Figurene viser migrering av ubehandlede (NT), PDT-behandlede og PCI-behandlede celler 0-66 timer etter lys. Såret i monolaget ble laget umiddelbart før belysning, og bilder er tatt med incucyte ved angitte tidspunkt etter lys. Forsøket er utført 2 ganger.

3.3.2 Cellemigrering 24 timer etter behandling

Dataene i figur 25 viser at cellemigreringen var lengere hemmet i PCI enn i PDT behandlede celler. Dette ble videre studert ved å modifisere sårhelingsassayet slik at såret i monolaget ble laget 24 timer etter belysning (figur 26). Såret i kontrollcellene ble med dette oppsettet helet 13 timer etter skraping. Sårhelingen var også med dette oppsettet hemmet både i PDT- og PCI behandlede celler, men migreringen var raskere i PDT behandlede celler der sårhelingen kunne detekteres 13 timer etter skraping, mens sikker migrering i PCI prøver ble detektert 37 timer etter skraping. Sårhelingen var fullstendig i PDT prøven 37 timer etter skraping, mens det i PCI prøven fremdeles var et detekterbart sår 49 timer etter skraping.

3 RESULTATER

Migrering 24 timer etter behandling:



Figur 26: **Migrering av celler 0-49 timer fra 24 timer etter belysning etter PDT og PCI; Sårhelingsassay:** Figurene viser migrering av ubehandlede (NT), PDT-behandlede og PCI-behandlede celler 0-49 timer etter skraping. Såret i monolaget ble laget 24 timer etter belysning, og bilder tatt med incucyte ved angitte tidsrom etter skraping. Forsøket er utført 2 ganger.

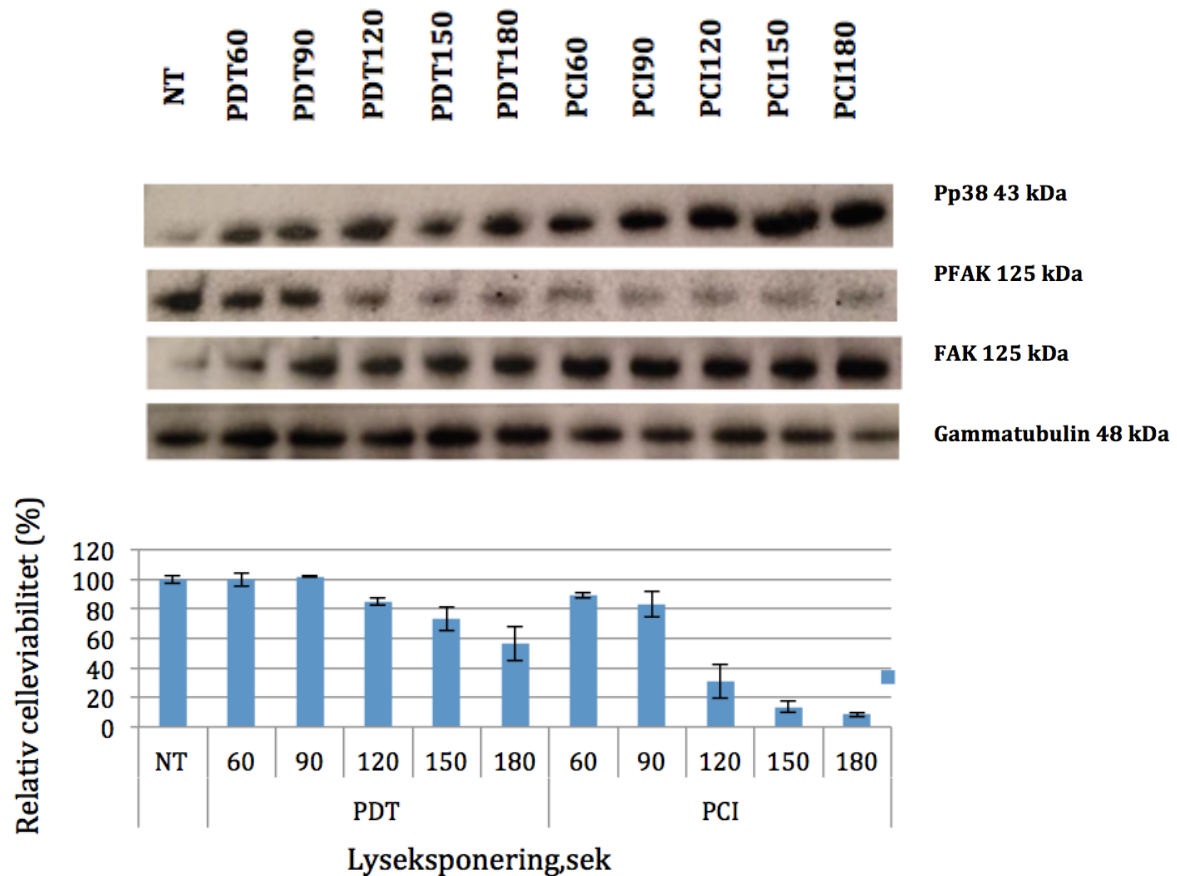
3.4 Analyse av p38 og FAK signalering

Cellemigrering er en cellulær prosess under kraftig kontroll av mange proteiner. Signaleringen gjennom to av slike proteiner, p38 og FAK, ble studert etter PDT og PCI av VEGF₁₂₁/rGel.

p38 signalering spiller en viktig rolle i migrering av kreftceller [5]. Western Blott analyser viste at både PDT og PCI økte fosforyleringen av p38, 30 minutter etter lys, og at fosforyleringen økte med økende lysdoser (figur 27). PCI-behandlede celler hadde en sterkere p38 aktivering enn PDT-behandlede celler.

FAK signalering spiller også en viktig rolle i migrering av kreftceller [14]. Western blott analysene 30 minutter etter lys, viste at FAK er lavere i NT og PDT60 sekunder, og at ekspresjonen blir oppregulert med økende lysdoser i både PDT og PCI. Fosforyleringen av FAK 30 minutter etter lys avtok med økende lysdoser (figur 27).

3 RESULTATER

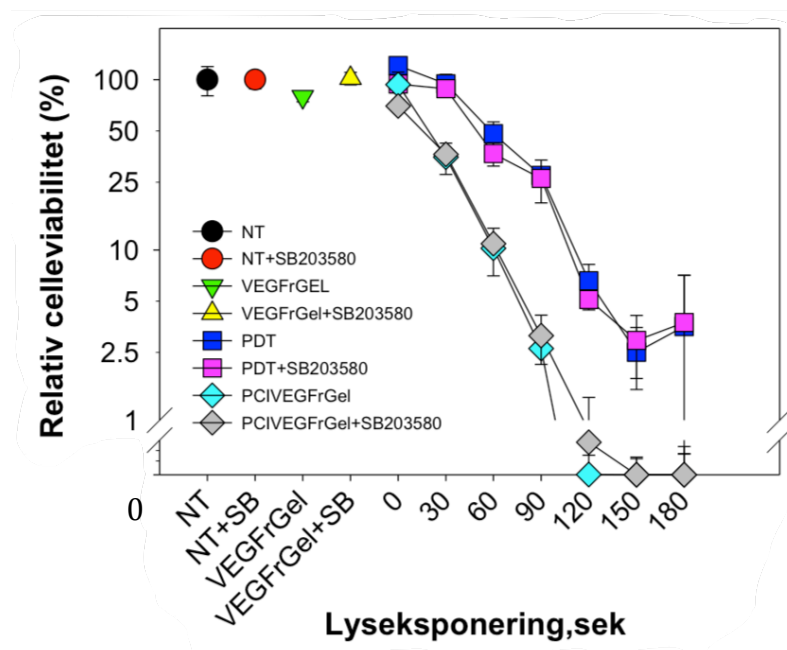


Figur 27: **P38 og FAK signalering 30 minutter etter PDT og PCI:** Western blott av Pp38, PFAK og FAK for ubehandlede (NT), PCI-behandlede og PDT-behandlede celler høstet 30 minutter etter økende lyseksponering som indikert. Gammatubulin viser loading. Viabilitet ble målt med MTT 48 timer etter lys eksponering. Representativt eksperiment. Forsøket med FAK er utført 2 ganger, og p38 er utført 3 ganger.

3.5 Effekt av p38 aktivering på overlevelse etter PDT og PCI

P38 hemmeren, SB203580, ble benyttet for å studere effekten av p38 aktivering på cellulær overlevelse etter PDT og PCI. Sensitiviteten til 4T1 for PDT og PCI av VEGF₁₂₁/rGel ble undersøkt med MTT viabilitetsassay, både med og uten hemmer (figur 28). Det ble brukt 0,5 nM VEGF₁₂₁/rGel.

Det ble ikke observert noe forskjell i overlevelse med og uten hemmer. 50 % drap ble oppnådd ved 30 sekunder lys for PCI av VEGF₁₂₁/rGel, mens 60 sekunder lys ga tilsvarende effekt for PDT.



Figur 28: **Cellulær overlevelse etter PDT og PCI av 0.5nM VEGF₁₂₁/rGel med inhibering av Pp38:** Relativ celleviabilitet er plottet som funksjon av lysdose. SB: SB203580-behandling. NT: Ingen-behandling. Resultatene er gjennomsnitt av tre paralleller. Errorbarene viser standard avvik. Forsøket et utført 1 gang.

4 Diskusjon

4.1 Diskusjon av resultater

Brystkreft oppdages vanligvis som en knute i selve brystvevet. En slik svulst kan ofte fjernes med en operasjon og pasienten blir frisk. Noen pasienter får imidlertid, tilbakefall i det opererte brystet eller i brystveggen, dersom brystet er fjernet. Tilbakefallet kan også være metastaser i lymfeknuter, skjelett, lunge, hjerne eller andre indre organer hvis kreften har gått ut i blodet (<http://www.felleskatalogen.no>, mai 2014). Tilbakefall kan komme lenge etter fjerning av primær tumor, og brystkreft er en veldig alvorlig sykdom på sikt (<http://www.felleskatalogen.no>, mai 2014). Årlig rammes ca. 2700 norske kvinner av brystkreft. Menn rammes også, men mye mer sjeldent. Sykdommen rammer som regel ikke barn, og har lav frekvens hos de under 30 år. Risikoen for å utvikle brystkreft stiger med alderen, og innen man fyller 75 år, er sannsynligheten for å få brystkreft litt over 10 % for kvinner (<http://www.felleskatalogen.no>, mai 2014). Brystkreft krever forskjellig behandling, avhengig av om kreften sitter i brystet, eller om kreften har spredd seg til andre deler av kroppen (<http://www.felleskatalogen.no>, mai 2014). Brystkreft behandles også med hensyn på kreftens ekspresjonsprofil av østrogen og HER-2.

Det finnes to typer brystkreft; den benigne typen som er ufarlig, og den maligne typen som er farlig og aggressiv. Når sykdommen er vist å være malign, blir kreften klassifisert i forskjellige alvorlighetsgrader. Klasse 4 brystkreft er den mest alvorligste, der kreftcellene har spredd seg fra brystet og til andre deler av kroppen og dannet fjernmetastaser (<http://www.nationalbrastcancer.org>, mai 2014). Brystkreft viser stor variasjon i veksthastighet og evne til å metastasere (<http://www.tidsskriftet.no>, mai 2014).

De fleste brystkreft i dag er kurerbare, med unntak av de trippel-negative. Trippel-negativ brystkreft er en av de mest aggressive, og behandlingsresistente kreftformene som finnes. Trippel-negativ brystkreft mangler ekspresjon av østrogenreseptor, progesteronreseptor og HER-2, og har ingen nytte av endokrin terapi eller trastuzumab [49]. Pasienter med trippel-negativ brystkreft har økt sannsynlighet for metastase og død, og en høyere forekomst av tilbakefall de fire første årene etter diagnose, mens

4 DISKUSJON

risikoen deretter er vist å synke [50]. Trippel-negative brystkreft er vist å ha økt ekspresjon av EGFR, og kan være kandidater for anti-EGFR terapi [50]. Det er ønskelig med en mer målrettet behandling av trippel-negativ brystkreft. 4T1 celler som er benyttet i denne oppgaven er en trippel-negativ brystkreft cellelinje. 4T1 er svært aggressiv, og Weyergang har tidligere vist at tumorer i mus når størrelse på 1000 mm³ i løpet av 15-20 dager. Modellen er kjent for å migrere [44] og metastaserer *in vivo* [44]. I denne oppgaven ble PCI av VEGF₁₂₁/rGel undersøkt på 4T1 celler med hensyn på toksisitet og migreringspotensiale. Toksisitetsstudiene i denne masteroppgaven viser at PCI av VEGF₁₂₁/rGel er svært effektivt for å drepe 4T1 celler. VEGF₁₂₁/rGel er egentlig designet for å virke på tumorvaskulaturen, men resultatene her viser at PCI av VEGF₁₂₁/rGel også kan gi en spesifikk behandling av trippel-negative tumorceller fra bryst. PCI av VEGF₁₂₁/rGel kan derfor representere en behandling som går på både tumorvaskulaturen og på tumorcellene, og kan muligens benyttes for å behandle aggressive kreftformer som trippel-negativ brystkreft.

VEGF₁₂₁/rGel er vist å binde seg til både VEGFR1 og VEGFR2. Begge disse reseptorene er overuttrykket på tumor-endotel. VEGFR2 er vist å være den viktigste reseptoren for VEGF₁₂₁/rGel induert vaskulær skade når VEGF₁₂₁/rGel brukes som monoterapi [51]. Denne oppgaven viser at PCI av VEGF₁₂₁/rGel virker mye bedre enn PCI av gelonin på 4T1 celler som uttrykker VEGFR1. Resultatene er i samsvar med nye resultater fra PCI gruppen som viser at PCI av VEGF₁₂₁/rGel utøver effekt både på VEGFR1 og VEGFR2 positive celler (manuskript in prep). VEGFR2 ble ikke detektert i 4T1 celler (resultatet er ikke vist). Uttrykkelse av VEGFR1 på 4T1 er i samsvar med tidligere publisert materiale på andre brystkreftmodeller [52, 53]. PCI av VEGF₁₂₁/rGel vil derfor kunne frigjøre VEGF₁₂₁/rGel i cytosol til både VEGFR1 uttrykkende tumorceller så vel som VEGFR1 og VEGFR2 uttrykkende endotelceller, og slik føre til proteinsynteseinhibasjon og celledød her. I tillegg vil behandlingen kunne gi ødeleggelse av vaskulatur induert av fotosensitiser og lys (PDT), og antakelig en aktivering av immunsystemet (PDT) [19, 21].

VEGFR1 og VEGFR2 ekspresjon er assosiert med endotelceller [54], og PCI av VEGF₁₂₁/rGel vil i videre studier evalueres på endotelceller. Legemidler rettet mot VEGFR1 og VEGFR2 finnes på dagens marked. Sunitinib, er en proteintyrosinkinaseinhibitor som hemmer flere tyrosinkinasereseptorer, blant annet

4 DISKUSJON

VEGFR1 og VEGFR2 (<http://www.felleskatalogen.no>, mai 2014). Sunitinib er vist å ha en bedre toksisitets profil enn tradisjonelle cytotoksiske molekyler i kjemoterapi som interagerer ikke-spesifikt med cellulært DNA og tubulin, og gir skade på friske vev [55]. Sunitinib er indusert ved renal celle carcinoma og gastrointestinale stromale tumorer, men kan også være til nytte hos pasienter med andre tumortyper [55]. Monoterapi med sunitinib har vist antitumor aktivitet i flere prekliniske brystkreftmodeller, både alene og i kombinasjon med kjemoterapi [56]. Blant trippel-negative brystkreftpasienter er det sett en respons på 15 % med sunitinib [57]. Dette indikerer at VEGFR målrettet behandling av trippel-negativ brystkreft kan være en god behandlingsstrategi. Spredning og metastasering er ansett som det største problemet med trippel-negativ brystkreft. Det var derfor av interesse å studere om PCI av VEGF₁₂₁/rGel kunne redusere cellemigrering for 4T1. To typer migreringsassay ble benyttet; Boyden kammer og sårhelingsassay. Det er vanligvis anbefalt å bruke mer enn én type metode siden ulike metodene har ulike fordeler og begrensninger. Boyden kammer analysene av 4T1 etter PCI av VEGF₁₂₁/rGel viste ingen forskjell i migrering etter PDT og PCI, og heller ingen forskjell mellom PDT og PCI. Sårhelingsassayet viste at både PDT og PCI hemmet migrering, og at PCI hemmet migrering i et lengere tidsintervall enn PDT.

Yang *et al.* viste i et sårhelingsassay og en Boyden kammer modell, at 5-ALA-PDT med en lysdose som drepte 10-20 % av cellene undertrykket migreringen av hode-nakke kreft cellene KJ-1 og Ca9-22 [16]. 5-ALA danner PpIX i mitokondrier og fører til apoptose og nekrose etter lyseksponering [58]. I en studie fra 2014 viste Wang *et al.* i et sårhelingsassay at fotosensitiseringen m-THPC i kombinasjon med lys hemmet migreringen av nasofaryngeal KJ-1 kreftceller, med en subletal dose som drepte 20 % av cellene. m-THPC akkumulerer i endoplasmatiske retikulum, og golgi apparatet [58]. PDT og PCI med relativt lave doser induserer tumordestruksjon ved tre prosesser [29]. ROS som er dannet under PDT og PCI kan gi tumorcellene en direkte skade og lede dem i apoptose, nekrose og/eller autofagi (se 1.2.3). PDT- og PCI behandlingen kan også ødelegge den tumorassosierte vaskulaturen, og i tillegg aktivere en immunrespons mot tumorcellene (se 1.2.4) [19, 29]. I studiene fra Yang *et al.* og Wang *et al.* ble migreringen ikke målt utover 16 og 24 timer. Det skjer ikke nødvendigvis nøyaktig det samme i hver eneste celle under PDT- og PCI behandling. Noen celler overlever behandlingen, mens andre celler dør av behandlingen de får. At cellene har dødd etter behandling kan være

4 DISKUSJON

vanskelig å bestemme før det har gått ca. 24 timer. De cellene som overlever kan deles inn i to; de som akkumulerer i G1 av cellesyklus etter behandling og deretter begynner å vokse, og de som ikke stopper opp men bare fortsetter å leve. Av de cellene som dør er det de som dør momentant, eller de som dør etter først akkumulering i G1. Dersom man f.eks. velger å gjøre MTT bare 2 timer etter belysning, finner man ved lave PDT doser liten forskjell på behandlede og ubehandlede celler, fordi de cellene som dør bruker lengre tid på å dø enn 2 timer. Dette er viktig å ta hensyn til i et sårhelingsassay. Det at celler ikke migrerer kort tid etter belysning betyr ikke nødvendigvis at behandlingen har gjort noe med migreringspotensialet direkte, men kan være et bilde på at cellene har akkumulert i cellesyklus.

Det kan derfor være mer riktig å studere migreringen 24 timer etter behandling, der de døende cellene har dødd, og celleprosessene i overlevende celler har kommet seg igjen. Slik studeres migreringspotensialet til de cellene som har overlevd behandlingen. Dataene som presenteres her med sårhelingsassay viser at PDT hemmer migrering også når såret dannes 24 timer etter lys. Vi mener derfor dataene bør tolkes dit at både PDT og PCI av VEGF₁₂₁/rGel hemmer migreringspotensialet i 4T1, i tillegg til å utøve en cytotoxisk effekt.

Cellemigrering gjennom en pore er ikke det samme som når cellene migrerer sammen i et sårhelingsassay. Boyden kammer forsøk har i tidligere studier vist stor usikkerhet, og forskjeller har blitt observert når celler fester seg til poremembranen for å migrere gjennom poren og til undersiden [59]. Forskjellene er påvirket av celletetthet og størrelse av filterporene. Slike påvirkninger, som ikke korrelerer direkte med cellenes evne til å migrere gjennom en pore, kan påvirke migrasjonen [59]. Dette kan forklare mangelen på migreringseffekt etter PDT og PCI i Boyden kammer modellen, sammenliknet med sårhelingsassay. I Boyden kammer forsøk kan cellene ha migrert før behandling (fra utsåing til lys). Prosedyren må optimaliseres og studeres nærmere for å trekke en konklusjon.

Det ser videre ut som PCI av VEGF₁₂₁/rGel hemmer migrering i større grad enn PDT. Dette kan være et resultat av VEGF₁₂₁/rGel. VEGF er en viktig mediator for angiogenese og migrering av endotelceller, men har de senere år også vært vist å stimulere til migrering av andre celler, der i blant kreftceller [51, 60]. PCI av VEGF₁₂₁/rGel fører til

4 DISKUSJON

hemming av proteinsyntese i VEGFR1 positive 4T1 celler, og man kan anta at dette kan hemme migreringspotensialet. Sunitinib og sorafenib, to antiangiogene legemidler som virker på VEGFR1 og VEGFR2 er vist å ha effekt på migrering [60]. Hemming av VEGF induisert signalering med PCI av VEGF₁₂₁/rGel kan derfor kanskje hemme migreringen av 4T1 celler, på den annen side er det viktig å huske på at VEGF er en VEGFR ligand og at VEGF₁₂₁/rGel derfor kan øke VEGFR signalering. Forskjellen i migrering i sårhelingsassayet mellom PDT og PCI kan også være relatert til det at vi bruker 90 sekunders belysning i både PDT- og PCI behandlede celler. De PCI-behandlede cellene blir da utsatt for en høyere toksisitet enn det de PDT-behandlede cellene gjør. Forsøk med PDT og PCI der lysdosene for de to metodene blir titrert til å inducere likt celledrap er forsøk som må gjøres. Dette er prøvd i denne studien, men trenger videre optimalisering.

En økt fosforylering av FAK er i flere cellelinjer forbundet med økt migrering.

I artikkelen til Yang *et al.*, inhiberte PDT fosforyleringen av FAK (Y397 og Y925) og nedstrømssignaleringen Src kinase og ERK 30 minutter etter belysning. En slik hemming kan være involvert i PDT induisert migrering/invaderingssuppresjon [16]. Fosforyleringen av Src kinase gikk tilbake til utgangspunktet 3 timer etter behandling, mens fosforylering av FAK (Y925) og ERK var fremdeles inhibert ved dette tidspunktet. 24 timer etter PDT var fosforyleringen av FAK tilbake på ubehandlet nivå, mens inhibering av ERK var fremdeles observert [16].

Western blott analysene av 4T1 viste at FAK er lavere i NT og PDT60 sekunder, og at ekspresjonen blir oppregulert med økende lysdoser i både PDT og PCI (figur 27).

Manglende FAK ekspresjon er forbundet med redusert migrering [14]. Dette stemmer ikke med sårhelingsassayet som viser at ubehandlede celler migrerer raskere enn PDT- og PCI behandlede celler. Siden ekspresjonen går opp etter behandling, mens aktiviteten går ned blir fraksjonen aktiv/ total FAK mye høyere for NT enn de behandlede cellene.

Fosforyleringen av FAK ble inhibert med økende lysdoser. FAK signaleringsveien ser derfor ut til å regulere migreringen av 4T1 ved TPCS_{2a} mediert PDT og PCI, og kan være med på å hemme migrasjonen. Fosforylering av FAK etter PDT og PCI av VEGF₁₂₁/rGel vil i videre studier evalueres 24, 48 og 72 timer etter belysning, for å undersøke om migrering i dette tidsrommet etter behandling kan være korrelert til økt fosforylering av FAK. I dette prosjektet ble det gjort forsøk som indikerte at FAK ble fosforylert 24 timer

4 DISKUSJON

etter behandling (resultat ikke vist). Dette forsøket må reproduseres for å konkludere her.

Uzdensky *et al.* i 2012 viste at PDT ikke endret på basal nivå av integriner involvert i cellulær festing til ekstracellulære matriks som er ansvarlige for intracellulær adhesjon, men at fosforyleringen av FAK på tyrosin 577 og 397 økte betydelig etter 1 time, som deretter ble inhibert, og igjen fikk en oppregulering 5,5 timer senere [61].

MAPK er viktig i cellulære prosesser og kontrollerer død, cellevekst, apoptose og overlevelse etter oksidativt stress [62]. ROS og singlett oksygen er vist å indusere p38 aktiviteten [63]. Aktivisering og funksjon av MAPK etter PDT er avhengig av celletype, fotosensitiser og dets cellulære lokalisasjon og lysdosen som blir brukt [62]. Castano *et al.* og andre forskere har vist at overekspresjon av p38 MAPK øker den cellulære resistensen til PDT [31, 62, 64]. Inhibering av p38 MAPK signaleringen utført av Almeida *et al.* i 2004 viste bedret PDT induisert apoptose [65].

Inhibering av p38 signaleringsveien i 4T1 cellene hadde ingen effekt på overlevelse etter PDT og PCI, selv om TPCS_{2a} mediert PDT- og PCI induerte p38 aktivisering i denne trippel-negative brystkreftlinjen. P38 signaleringsveien ser derfor ikke ut til å regulere sensitiviteten til 4T1 for TPCS_{2a} mediert PDT og PCI. Resultatene er ikke i samsvar med Weyergang *et al.* som viste at hemmeren SB203580 svekket TPPS_{2a}- PDT induisert og PCI av gelonin induisert toksisitet i NuTu-19 celler [62]. Forskjellene kan skyldes ulike celler og ulike fotosensitisere i ulike konsentrasjoner [62].

Resultatene her er imidlertid i overenstemmelse med en tidligere publikasjon på LFS- og HeLa-celler der p38 ble aktivert ved Photophrin mediert PDT, men hvor inhibering av p38 signaleringen ikke endret sensitiviteten av cellene til Photophrin mediert PDT [63].

Kartlegging av den intracellulære signaloverføringen etter PDT er viktig for å forstå mekanismer som induserer celledød etter PDT og PCI, og kan bli brukt til å finne legemidler passende for PCI [62]. FAK og p38 signaleringsveien er indikert som mulige mediatorer for cellemigrering i 4T1, og PDT og PCI er vist å ha effekt på denne signaleringsveien. Måltrettet terapi med PCI mot mekanismer som aktiverer p38 og FAK, kan kanskje bli brukt til å hemme cellemigrering.

4 DISKUSJON

Selv om vi i denne masteroppgaven ikke så effekt på celleviabilitet etter PDT og PCI med p38 hemming, kan p38 aktivering likevel være viktig for cellemigrering [62]. Måltrettet inhibering av p38 er vist å undertrykke tumorassosiert endotelcellemigrering i respons til Hypericin-mediert PDT ved å blokkere frigjøringen av VEGF [66].

I en klinisk studie er det vist at PDT kan ha effekt på metastaseringspotensialet. 15 av 45 pasienter som ble behandlet med 5-ALA-PDT mottok mer enn én behandling, og ingen av pasientene utviklet metastase under oppfølging [16].

Totalt sett viser denne masteroppgaven at PDT og PCI kan hemme effekten av migrering på 4T1 celler, men indikerer samtidig at celler som overlever behandlingen migrerer. Oppgaven viser også at det er interessant å studere cellenes evne til å migrere over et lengre tidsintervall (>24 timer), enn det som er gjort i tidligere publikasjoner.

4.2 Diskusjon av materialer og metode

Metodene benyttet i denne oppgaven har flere feilkilder som kan ha hatt innflytelse på resultatene.

4.2.1 Uønsket belysning

Selv om cellene ble utsatt for minst mulig lys fra omgivelsene etter tilsetning av fotosensitiser, vil det alltid være noe lys tilstede når vi mikroskoperer, tar plater inn og ut av inkubatoren, og arbeider i samme omgivelser med andre som benytter lys i LAF-benken. Dette kan gjøre fotosensitiseringen aktiv før cellene blir belyst med blått lys, og kan resultere i for lave signaler i kontrollene som igjen kan føre til lavere observert toksisitet av behandling. For lave signaler var imidlertid ikke et problem i gjennomføringen i denne oppgaven, da fotosensitiser-behandlede celler uten blått lys viste samme overlevelse som ubehandlede kontroller.

4.2.2 Overlevelse målt med MTT assay

MTT er et mål på den mitokondrielle aktiviteten i levende celler. Noen døde celler kan fremdeles ha mitokondrieaktivitet, og dette kan gi utslag i resultatet. Derfor er det viktig at det går lang nok tid fra behandling til MTT- assay. Uavhengig av PDT eller PCI ventet vi i 2 døgn før vi tok MTT, dette er tidligere vist å være tilstrekkelig for andre cellelinjer [38, 64]. En studie som undersøker optimalt tidsrom for MTT på 4T1 celler etter PDT og PCI bør likevel gjøres.

4.2.3 Telling og utsåing av celler

For å få reproducerbare resultater ble antall celler talt før utsåing. Dette ble gjort ved å pipettere 20 μ l av cellesuspensjonen til et tellekammer og talt med et mikroskop. At løsningen ikke var homogen, og at uttaket av suspensjonen ikke var representativt for resten av løsningen var en mulig feilkilde. Selv om det tas ut feil mengde med cellesuspensjon, blandes suspensjonen godt før utsåing slik at det blir like mange celler i hver brønn. Forskjell i tetthet ved behandlingen mellom forsøkene kan gi variasjon i

celletoksisitet, men dette var imidlertid ikke et problem i gjennomføringen i denne oppgaven siden toksisitetsdataene var ganske like.

4.2.4 Håndtering av Boyden kammer utstyr

At det var flere sikt å se gjennom når vi jobbet med å mikropore insert brønnene gjorde denne metoden ganske krevende å jobbe med, særlig ved mikroskopering når cellene skulle kontrolleres etter de ulike behandlingsprosedyrene. Det var viktig å være observant i at insert brønnen var plassert nedi medium- brønnen i 48-brønners platen, ellers ville cellene tørket ut. Når cellene skulle vaskes med medium, var det ikke alltid like lett, siden man fikk en følelse av at cellene ble sugd av, men dette gikk som regel fint. Det ble også prøvd å vaske insert brønnene ved å dyppe brønnen i 2 ulike skåler med medium, men dette ble mer unøyaktig siden noe medium kunne bli igjen i brønnen og slik påvirke resultatet dersom det ikke ble gjort likt for alle brønner. I brønnene med serumforskjell hvor det ble benyttet en bomullsdott til å fjerne cellene på innsiden av insert brønnen rett før tilsetning av MTT, kan også være en mulig feilkilde, dersom alle brønner ikke behandles likt med bomullsdotten, og dette kan gi utslag på resultatet.

Ved måling av MTT tok prosedyren ofte lengre tid, siden løsningen i insert brønnen først ble pipettert over i 96-brønners plate før det ble målt absorbans på dette. Dersom man ikke klarer å pipettere ut hele løsningen over i 96-brønners plate, kan dette være en mulig feilkilde. Denne prosedyren trenger videre optimalisering før man kan trekke noen konklusjoner av resultatene.

4.3 Videre studier

Trippel-negativ brystkreft har dårlig prognose grunnet høy frekvens av spredning, og selv om man opererer vekk primærtumoren opplever mange pasienter tilbakefall med metastaser og dårlig prognose noen år etterpå. Siden denne typen brystkreft er vanskelige å behandle, er det her vi vil videre i dette prosjektet. Vi vil også studere om effekten av PDT og PCI av VEGF₁₂₁/rGel på migreringspotensialet i 4T1, også kan sees i andre celler. 4T1 celler er trippel-negativ brystkreft, og vi ønsker å studere andre trippel-negative brystkreft cellelinjer. Vi vil også studere effekten av PCI på migrering *in vivo*, og se om hemmeren virkelig hemmet p38 ved hjelp av western på MAPKAPK-2.

4 DISKUSJON

Senere ønsker vi å studere p38 hemmeren på migrering, og studere effekten av FAK både på migrering og overlevelse. Siden VEGFR er assosiert med endotelceller vil vi også studere effekten av PCI av VEGF₁₂₁/rGel på endotelceller. Det vil også være interessant å bruke legemidler som virker spesifikt på VEGF reseptorer, eks sunitinib med PCI av VEGF₁₂₁/rGel, og studere hvordan dette påvirker migreringen.

5 Konklusjon

PCI av VEGF₁₂₁/rGel ble i denne masteroppgaven vist å være en svært effektiv metode for å indusere VEGFR1 spesifikk toksisitet i den trippel negative bryst cellelinjen 4T1. PCI av VEGF₁₂₁/rGel ble i tillegg vist å hemme cellemigrering, og hemmingen etter PCI av VEGF₁₂₁/rGel var større enn hemming etter PDT. FAK og p38 signalering ble indikert som mulige mediatorer for cellemigrering i 4T1, og PDT og PCI ble vist å ha effekt på denne signaleringen. Denne studien har tatt for seg cellemigrering i et lengere tidspunkt etter PDT behandling enn hva som tidligere har vært vist. Migrering i tidsrommet 24 timer eller mer etter behandling, kan synes fornuftig ettersom døende celler da vil være døde, og celleprosesser i overlevende celler har kommet seg igjen. Videre studier med PCI av VEGF₁₂₁/rGel på migrering og metastaseringspotensialet i trippel-negativ brystkreft, er under planlegning både *in vitro* og *in vivo*.

Referanser

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
2. Gupta, G.P. and J. Massagué, *Cancer metastasis: building a framework*. Cell, 2006. **127**(4): p. 679-695.
3. Bacac, M. and I. Stamenkovic, *Metastatic cancer cell*. Annu. Rev. pathmechdis. Mech. Dis., 2008. **3**: p. 221-247.
4. Steeg, P.S., *Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges*. Nature medicine, 2006. **12**(8): p. 895-904.
5. Huang, C., K. Jacobson, and M.D. Schaller, *MAP kinases and cell migration*. Journal of cell science, 2004. **117**(20): p. 4619-4628.
6. Wagner, E.F. and Á.R. Nebreda, *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development*. Nature Reviews Cancer, 2009. **9**(8): p. 537-549.
7. Brown, L.F., et al., *Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer*. Human pathology, 1995. **26**(1): p. 86-91.
8. Folkman, J. *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis*. in *Seminars in oncology*. 2002. Elsevier.
9. Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005. **6**(1): p. 56-68.
10. Petit, V. and J.P. Thiery, *Focal adhesions: structure and dynamics*. Biology of the Cell, 2000. **92**(7): p. 477-494.
11. Woodhouse, E.C., R.F. Chuaqui, and L.A. Liotta, *General mechanisms of metastasis*. Cancer, 1997. **80**(S8): p. 1529-1537.
12. Parsons, J.T., et al., *Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5606-13.
13. Mitra, S.K. and D.D. Schlaepfer, *Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells*. Current opinion in cell biology, 2006. **18**(5): p. 516-523.
14. Sieg, D.J., et al., *FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration*. Nature cell biology, 2000. **2**(5): p. 249-256.
15. Zhao, J. and J.-L. Guan, *Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer*. Cancer and Metastasis Reviews, 2009. **28**(1-2): p. 35-49.
16. Yang, T.-H., et al., *Photodynamic therapy suppresses the migration and invasion of head and neck cancer cells in vitro*. Oral oncology, 2007. **43**(4): p. 358-365.
17. Yamaguchi, H. and J. Condeelis, *Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2007. **1773**(5): p. 642-652.
18. Schlaepfer, D.D. and S.K. Mitra, *Multiple connections link FAK to cell motility and invasion*. Current opinion in genetics & development, 2004. **14**(1): p. 92-101.
19. Dolmans, D.E., D. Fukumura, and R.K. Jain, *Photodynamic therapy for cancer*. Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(5): p. 380-387.
20. Von Tappeiner, H. and A. Jesionek, *Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen*. Münch Med Wochenschr, 1903. **47**: p. 2042-2044.

21. Agostinis, P., et al., *Photodynamic therapy of cancer: an update*. CA: a cancer journal for clinicians, 2011. **61**(4): p. 250-281.
22. Moan, J. and K. BERG, *The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen*. Photochemistry and photobiology, 1991. **53**(4): p. 549-553.
23. Høgset, A., et al., *Photochemical internalisation in drug and gene delivery*. Advanced drug delivery reviews, 2004. **56**(1): p. 95-115.
24. Berg, K., et al., *Porphyrin - related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications*. Journal of microscopy, 2005. **218**(2): p. 133-147.
25. Juzeniene, A., K.P. Nielsen, and J. Moan, *Biophysical aspects of photodynamic therapy*. Journal of environmental pathology, toxicology and oncology, 2006. **25**(1-2).
26. Bugelski, P.J., C.W. Porter, and T.J. Dougherty, *Autoradiographic distribution of hematoporphyrin derivative in normal and tumor tissue of the mouse*. Cancer Research, 1981. **41**(11 Part 1): p. 4606-4612.
27. Kessel, D., *Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization*. Cancer letters, 1986. **33**(2): p. 183-188.
28. Patrice, T., *Photodynamic therapy*. Vol. 2. 2003: Royal Society of Chemistry.
29. Buytaert, E., M. Dewaele, and P. Agostinis, *Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2007. **1776**(1): p. 86-107.
30. Bhuvaneswari, R., et al., *The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis*. Cellular and molecular life sciences, 2009. **66**(14): p. 2275-2283.
31. Castano, A.P., P. Mroz, and M.R. Hamblin, *Photodynamic therapy and anti-tumour immunity*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(7): p. 535-545.
32. Weyergang, A., et al., *Photochemical internalization of tumor - targeted protein toxins*. Lasers in surgery and medicine, 2011. **43**(7): p. 721-733.
33. Dietze, A., et al., *Photochemical internalization (PCI): a new modality for light activation of endocytosed therapeutics*. Journal of environmental pathology, toxicology and oncology, 2006. **25**(1-2).
34. Norum, O.-J., et al., *Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy: from bench towards bedside medicine*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2009. **96**(2): p. 83-92.
35. Berg, K., *Photochemical Internalization: From Bench to Bedside with a Novel Technology for Targeted Macromolecule Therapy*. Handbook of Photomedicine, 2013: p. 427.
36. Prasmickaite, L., et al., *Photochemical disruption of endocytic vesicles before delivery of drugs: a new strategy for cancer therapy*. British journal of cancer, 2002. **86**(4): p. 652-657.
37. Berg, K., et al., *Site-specific drug delivery by photochemical internalization enhances the antitumor effect of bleomycin*. Clinical cancer research, 2005. **11**(23): p. 8476-8485.
38. Selbo, P.K., et al., *Photochemical internalization provides time-and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules*. Journal of Controlled Release, 2010. **148**(1): p. 2-12.
39. Berg, K., et al., *Photochemical internalization a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol*. Cancer Research, 1999. **59**(6): p. 1180-1183.

40. Berg, K., et al., *Photochemical internalization (PCI): A novel technology for activation of endocytosed therapeutic agents*. Medical Laser Application, 2006. **21**(4): p. 239-250.
41. Veenendaal, L.M., et al., *In vitro and in vivo studies of a VEGF121/rGelolin chimeric fusion toxin targeting the neovasculature of solid tumors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(12): p. 7866-7871.
42. Weyergang, A., et al., *Photochemical internalization augments tumor vascular cytotoxicity and specificity of VEGF₁₂₁/rGel fusion toxin*. Journal of Controlled Release, 2014. **180**: p. 1-9.
43. Bull-Hansen, B., et al., *Photochemical activation of the recombinant HER2-targeted fusion toxin MH3-B1/rGel; Impact of HER2 expression on treatment outcome*. Journal of Controlled Release, 2014. **182**: p. 58-66.
44. Pulaski, B.A. and S. Ostrand - Rosenberg, *Mouse 4T1 breast tumor model*. Current protocols in immunology, 2001: p. 20.2. 1-20.2. 16.
45. Tao, K., et al., *Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer*. BMC cancer, 2008. **8**(1): p. 228.
46. Wang, J.T.-W., et al., *Photophysical and photobiological properties of a sulfonated chlorin photosensitizer TPCS 2a for photochemical internalisation (PCI)*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2013. **12**(3): p. 519-526.
47. Berg, K., et al., *Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS2a), a novel photosensitizer developed for clinical utilization of photochemical internalization*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2011. **10**(10): p. 1637-1651.
48. Oppegard, S.C., et al., *Precise control over the oxygen conditions within the Boyden chamber using a microfabricated insert*. Lab on a Chip, 2010. **10**(18): p. 2366-2373.
49. Foulkes, W.D., I.E. Smith, and J.S. Reis-Filho, *Triple-negative breast cancer*. New England journal of medicine, 2010. **363**(20): p. 1938-1948.
50. Dent, R., et al., *Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence*. Clinical Cancer Research, 2007. **13**(15): p. 4429-4434.
51. Mohamedali, K.A., et al., *Cytotoxicity of VEGF(121)/rGel on vascular endothelial cells resulting in inhibition of angiogenesis is mediated via VEGFR-2*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 358.
52. Schmidt, M., et al., *Expression of VEGFR-1 (Flt-1) in breast cancer is associated with VEGF expression and with node-negative tumour stage*. Anticancer research, 2008. **28**(3A): p. 1719-1724.
53. Wu, Y., et al., *The vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR - 1) supports growth and survival of human breast carcinoma*. International journal of cancer, 2006. **119**(7): p. 1519-1529.
54. Neufeld, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. The FASEB Journal, 1999. **13**(1): p. 9-22.
55. Faivre, S., et al., *Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development*. Nature Reviews Drug Discovery, 2007. **6**(9): p. 734-745.
56. Burstein, H.J., et al., *Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(11): p. 1810-1816.
57. Normanno, N., et al., *Target-based therapies in breast cancer: current status and future perspectives*. Endocrine-related cancer, 2009. **16**(3): p. 675-702.

58. Wang, C.P., et al., *Meta-tetrahydroxyphenyl chlorine mediated photodynamic therapy inhibits the migration and invasion of a nasopharyngeal carcinoma KJ-1 cell line*. J Formos Med Assoc, 2014. **113**(3): p. 173-8.
59. Decaestecker, C., et al., *Can anti - migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration*. Medicinal research reviews, 2007. **27**(2): p. 149-176.
60. Reddy, S., M. Raffin, and V. Kaklamani, *Targeting angiogenesis in metastatic breast cancer*. The oncologist, 2012. **17**(8): p. 1014-1026.
61. Uzdensky, A., et al., *Dynamics of signaling, cytoskeleton and cell cycle regulation proteins in glioblastoma cells after sub-lethal photodynamic treatment: antibody microarray study*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2012. **1820**(7): p. 795-803.
62. Weyergang, A., O. Kaalhus, and K. Berg, *Photodynamic therapy with an endocytically located photosensitizer cause a rapid activation of the mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase, p38, and c-Jun NH2 terminal kinase with opposing effects on cell survival*. Molecular cancer therapeutics, 2008. **7**(6): p. 1740-1750.
63. Tong, Z., et al., *Activation of the stress-activated JNK and p38 MAP kinases in human cells by Photofrin-mediated photodynamic therapy*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2003. **71**(1): p. 77-85.
64. Olsen, C.E., et al., *Circumvention of resistance to photodynamic therapy in doxorubicin-resistant sarcoma by photochemical internalization of gelonin*. Free Radical Biology and Medicine, 2013. **65**: p. 1300-1309.
65. Almeida, R.D., et al., *Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2004. **1704**(2): p. 59-86.
66. Hendrickx, N., et al., *Targeted inhibition of p38 α MAPK suppresses tumor-associated endothelial cell migration in response to hypericin-based photodynamic therapy*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. **337**(3): p. 928-935.

Vedlegg

Vedlegg A

Løsninger til SDS-PAGE og Western blotting

1 x Lyseringsbuffer til SDS-PAGE

200 μ l 5 x Lane Marker Reducing Sample Buffer (Thermo Scientific, USA)

800 μ l ddH₂O

1 x Runningbuffer

100 mL 10 x Runningbuffer (Bio-Rad)

ad 1 L ddH₂O

Transferbuffer

3,75 g SDS (Bio-Rad)

15,1 g Trisbase (Bio-Rad)

71,4 g Glycin (Bio-Rad)

1 L metanol (VWR)

ad 5 L dH₂O

10 x TBS

12,11 g Trisbase (Bio-Rad)

87,66 g NaCl (Sigma-Aldrich)

ad 1 L dH₂O

pH 7,6

1 x TTBS

100 mL 10 x TBS

1 mL Tween 20 (Sigma-Aldrich)

ad 1 L dH₂O

5 % skummet melk

5 g skummet melkepulver (Sigma-Aldrich)

100 ml 1 x TTBS

5 % BSA

5 g BSA (Sigma-Aldrich)

100 ml 1 x TTBS

Vedlegg B

Stige for SDS-PAGE

Substans:	Produsent:	Fortynnet i:	Fortynning:	2 ^o Antistoff:
Kaleidoskop (161-03-75)	Bio-Rad	Samplebuffer	1:4	Ingen
Biotinylated ladder (7727)	Cell Signaling	Samplebuffer	1:4	Anti-biotin

Primære antistoff brukt for immunodeteksjon i Western blott

1 ^o antistoff	Produsent:	Fortynnet i:	Fortynning:	2 ^o antistoff
Anti-Pp38-MAPK (9216)	Cell Signaling	5 % melk	1:1000	Anti-mus
Anti-FAK (3285)	Cell Signaling	5 % BSA	1:1000	Anti-kanin
Anti-Phospho-FAK (3283)	Cell Signaling	5 % BSA	1:1000	Anti-kanin
Anti-gammatubulin (T5326)	Sigma Aldrich	5 % melk	1:5000	Anti-mus
Anti-VEGF Receptor 1 antibody (Y103)	Abcam	5% melk	1:1000	Anti-mus

Sekundære antistoff brukt for immunodeteksjon i Western blott:

2 ^o Antistoff	Produsent:	Fortynnet i:	Fortynning:
Anti-biotin (7075)	Cell Signaling	5 % melk	1:1000
Anti-mus (7076)	Cell Signaling	5 % melk	1:1000
Anti-kanin (7074s)	Cell Signaling	5 % melk	1:1000